

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1938-1939. N° 2

RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 9 Juin 1939

pour obtenir le Diplôme supérieur de Pharmacien de 1^{re} classe

PAR

JEAN DORCHE

né le 4 novembre 1908, à GAP (Hautes-Alpes)

1939

IMPRIMERIE A. VOLLAIRE & C^{ie}

V. VOLLAIRE Succ^r

32, Rue Carnot - GAP

**Recherches sur le Dosage
de l'Acide Oxalique**

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
Année scolaire 1938-1939. N° 2

RECHERCHES SUR LE DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE

THÈSE

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

et soutenue publiquement le 9 Juin 1939

pour obtenir le Diplôme supérieur de Pharmacien de 1^{re} classe

PAR

JEAN DORCHE

né le 4 novembre 1908, à GAP (Hautes-Alpes)

1939

IMPRIMERIE A. VOLLAIRE & C^{ie}

V. VOLLAIRE Succ^r

32, Rue Carnot - GAP

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ.
Doyen	M. J. LEPINE
Assesseur	M. A. MOREL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. LANNOIS, HUGOUNENQ, PIC, CONDAMIN,
PAVIOT, NICOLAS, VILLARD, NOVE-JOSSERAND, TIXIER, COLLET, GAYET, CLUZET.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	{	MM. FROMENT. SAVY.
Cliniques chirurgicales		PATEL. BERARD.
Cliniques obstétricale et Accouchements		VORON.
Clinique ophtalmologique		BONNET.
Cliniques dermatologique et syphiligraphique		FAVRE.
Clinique neurologique et psychiatrique		LEPINE (J.).
Clinique médicale infantile		MOURIQUAND.
Clinique gynécologique		COTTE.
Clinique Oto-rhino-laryngologie		REBATTU.
Clinique urologique		CIBERT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie		TAVERNIER.
Clinique et prophylaxie de la tuberculose		COURMONT.
Clinique des maladies infectieuses		J. CHALIER.
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie		PONTHUS.
Chimie biologique et médicale		FLORENCE.
Chimie organique et Toxicologie		MOREL.
Matière médicale et Botanique		MANCEAU.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale		GUIART.
Anatomie		LATARJET.
Histologie		POLICARD.
Physiologie		HERMANN.
Pathologie interne		CORDIER.
Pathologie générale et thérapeutique		CADE.
Anatomie pathologique		J.-F. MARTIN.
Chirurgie opératoire		SANTY.
Médecine expérimentale et comparée et Bactériologie		ARLOING (F.).
Médecine légale		Etienne MARTIN.
Hygiène		ROCHAIX.
Pharmacie et Pharmacologie		LEULIER.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie		PIERY.

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Chargé d'un cours d'Anatomie médico-chirurgicale	MM. THEVENOT (Léon).
Chargé d'un cours d'Embryologie	NOEL.

AGRÉGÉS

MM.	MM.	MM.	MM.
GABRIELLE	GUILLEMINET	DE ROUGEMONT	MORIN
DECHAUME	MORENAS	P. RAVAUULT	BERTRAND
BERNHEIM	REVOL	PIGEAUD	CLAVEL
POLLOSSON	ENSELME	CROIZAT	LEVRAIT
CHAMBON	SEDALLIAN	DELORE	
EPARVIER	CREYSSEL	JOSSERAND	

EXAMINATEURS DE LA THESE

LEULIER, président ; MOREL, professeur ; CHAMBON, agrégé ; REVOL, agrégé
La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations
qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et
qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. LEULIER
PROFESSEUR DE PHARMACIE ET DE PHARMACOLOGIE
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. MOREL

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
PROFESSEUR DE CHIMIE ORGANIQUE ET DE TOXICOLOGIE
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ M. CHAMBON

PHARMACIEN DES HOPITAUX

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ L. REVOL

PHARMACIEN DES ASILES

A MES MAITRES

DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
ET DES HOPITAUX DE LYON



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

La soutenance de cette thèse est pour nous l'occasion d'exprimer notre reconnaissance à ceux qui nous ont aidé de leurs conseils et de leur sympathie.

M. le Professeur LEULIER nous a fait, il y a près de trois ans, la grande faveur de nous accepter dans son laboratoire et de nous charger du cours de Pharmacie galénique. Nous n'oublierons jamais l'accueil réconfortant qu'il nous fit à cette époque. Puis, il nous a permis de poursuivre avec lui ses recherches sur l'acide oxalique qui ont abouti au travail que nous présentons aujourd'hui. C'est avec une confiance enthousiaste que nous sommes devenu son élève, que nous avons sollicité ses directives et ses critiques. Notre plus cher désir est de continuer à collaborer avec notre maître ; qu'il soit assuré de notre fidèle dévouement et de notre infinie reconnaissance.

M. le Professeur MOREL nous a fait l'honneur de nous confier un poste d'assistant dans son laboratoire de l'Institut Bactériologique. C'est lui qui nous a orienté et guidé vers les carrières hospitalière et universitaire. En lui faisant hommage de ce travail qu'il a bien voulu accepter de juger, nous le prions de croire à nos vifs

remerciements et nous l'assurons de notre respectueuse gratitude.

Nous sommes heureux de compter parmi nos Juges M. le Professeur agrégé Chambon. Nous avons eu souvent recours à ses conseils scientifiques ou professionnels et nous le remercions de son accueil toujours bienveillant. Nous présentons à celui qui fut notre maître tant à la Faculté que dans les Hôpitaux, nos sentiments de sincère attachement.

M. le Professeur agrégé REVOL a été notre conférencier d'Internat ; depuis cette époque nous avons toujours trouvé en lui un guide amical et sûr. A chaque examen ou concours, en même temps qu'il nous communiquait son enthousiasme, il mettait à notre disposition sa bibliographie et sa documentation personnelles. Notre entrée dans le laboratoire du Professeur LEULIER nous a encore rapproché de lui. Il nous fait l'honneur de nous traiter d'ami ; ces quelques phrases de remerciements sont un bien faible témoignage de notre attachement.

Nous ne saurions oublier nos autres maîtres de la Faculté de Pharmacie, en particulier M. le Professeur MANCEAU. Nous avons toujours, et encore tout récemment, bénéficié de sa bienveillance et de son appui. Nous l'en remercions très vivement.

Nos remerciements vont aussi à nos maîtres dans les Hôpitaux :

A M. le Professeur PAVIOT qui nous a confié pendant quatre ans le poste de chef de laboratoire de clinique et nous a encouragé dans la voie des recherches.

A M. le Professeur FROMENT qui a bien voulu nous conserver le poste de chef de laboratoire et ne cesse de s'intéresser à notre tâche hospitalière.

A M. le Professeur J. CHALIER dont nous avons été l'interne en Pharmacie et auprès de qui nous allons encore si souvent chercher des conseils et des directives.

A M. le Professeur agrégé GATE dont la direction nous a été si utile pendant les semestres d'Internat en Pharmacie passés près de lui.

A M. le Docteur BOULUD, pharmacien honoraire des Hôpitaux qui a été pour nous un guide tant au point de vue hospitalier qu'au point de vue administratif et professionnel.

A M. le Docteur RIZARD qui avant d'être à la Pharmacie Centrale a été pour nous à l'hôpital de l'Antiquaille un pharmacien chef particulièrement bienveillant.

Nous remercions encore nos camarades d'Internat, notamment nos conférenciers REVOL, BADINAND, CREVAT, CHATAIN.

Nous sommes particulièrement reconnaissant à nos internes qui pendant les soirées de garde ont surveillé les longues extractions nécessaires à nos recherches.

Enfin c'est l'Institution de l'Internat en Pharmacie qu'il nous faut remercier en la personne de ses fondateurs et de ses défenseurs, car c'est grâce à l'Internat que nous avons pu mener à bien nos études, et c'est nos années d'hôpitaux qui comptent comme les plus belles de notre vie.

INTRODUCTION

L'aspect si caractéristique de l'oxalate de calcium urinaire et des calculs qui en dérivent, a, depuis longtemps retenu l'attention des cliniciens et des chimistes. Par suite, de nombreux analystes ont essayé de déterminer les conditions d'apparition de ces calculs et, d'une manière plus générale, ont essayé de préciser le cycle alimentaire de l'acide oxalique. Il en résulte un grand nombre de mémoires, mais la discordance des résultats oblige LAMBLING [43] à écrire en 1921 : « La question de l'origine de l'acide oxalique reste posée toute entière ». Comme en 1921, le problème reste intégralement posé aujourd'hui encore.

Sans doute, on est à peu près d'accord sur la présence d'oxalate de chaux dans l'urine normale où il est dissous à un taux très supérieur à celui que pourrait faire supposer sa solubilité dans l'eau. Dans certaines circonstances physiologiques ou pathologiques, il peut précipiter en donnant naissance soit à de petits cristaux, soit à de véritables calculs. Le taux de l'oxalurie normale est soumis à certaines influences dont une des mieux établies est celle du régime alimentaire. Mais si l'on compare les résultats apportés par divers auteurs,

on est frappé par la discordance des taux correspondant à des conditions d'expériences identiques.

Ces discordances étonnantes vont s'accroître en ce qui concerne le sang, le liquide céphalo-rachidien et les divers liquides pathologiques. La quantité d'acide oxalique qu'ils renferment est minime, et il est difficile d'isoler l'acide à un état de pureté satisfaisant. De ce fait, l'oxalémie est étudiée depuis moins longtemps que l'oxalurie. Pour une semblable raison, les résultats obtenus par les auteurs sont souvent très différents. Certains affirment que l'oxalémie normale de l'homme ou des mammifères atteint et dépasse 50 mgr. par litre de sérum, d'autres au contraire la déclarent insaisissable par nos procédés actuels, en tout cas inférieure à 2 mgr. par litre.

Il est indubitable que de tels résultats proviennent de l'imperfection plus ou moins évidente de techniques non comparables entre elles.

L'objet de ce travail est d'abord d'exposer les méthodes anciennes et les critiques dont elles sont passibles, puis d'apporter, autant que faire se peut, une technique appropriée, sinon simple, qui puisse permettre d'aborder l'étude du métabolisme de l'acide oxalique.

Première Partie

Travaux antérieurs

CHAPITRE PREMIER

Travaux antérieurs concernant l'acide oxalique de l'urine

C'est dans le règne végétal que l'acide oxalique a été découvert. En 1773, SAVARY retire du suc d'oseille un composé acide de nature inconnue que SCHEELE en 1785 identifie avec l'acide oxalique, récemment obtenu par lui et avec l'acide saccharin de BERGMAN obtenu par oxydation nitrique du sucre. Dans la suite de nombreuses publications montrent que l'acide oxalique est très répandu dans le monde végétal (FOURCROY, VAUQUELIN, BRACONNOT). Puis les recherches s'orientent vers le règne animal. BERGMAN avait, dès 1781 dans « *Dissertatio de acido sacchari* », montré la présence de son acide saccharin dans les organismes animaux. BUGNATELLI, en 1787 dans « *Lithologia humana* », signale la présence de cristaux particuliers dans certains sédiments urinaires. En 1797, WOLLASTON constate que les calculs « mûrifformes » sont constitués par ces mêmes cristaux, dont SCUDAMORE établit enfin la nature chimique. Ces cristaux d'oxalate de chaux sont décrits en 1842 par

GOLDING BIRD comme un des symptômes de « l'oxalurie ». Celle-ci étant caractérisée en outre par des troubles nerveux et digestifs.

I. — PREMIÈRES MÉTHODES D'ÉVALUATION

Les premières méthodes sont purement qualitatives, ainsi la méthode de BENEKE consiste à abandonner l'urine dans un verre conique pendant 24 heures et à apprécier microscopiquement le nombre des cristaux d'oxalate de chaux, les urates étant dissous par la chaleur et les phosphates par l'acide acétique.

De tels examens furent reconnus comme très insuffisants lorsque NEUBAUER eut montré qu'après filtration, on pouvait encore déceler de l'acide oxalique dans l'urine. Aussi apparaissent les premières méthodes de dosage.

La méthode de BUCKEIM

L'urine est neutralisée par l'ammoniaque, concentrée au 1/6 de son volume, acidulée par l'acide acétique et additionnée de chlorure de calcium. Le précipité est recueilli au bout de quelques jours sur un petit filtre puis lavé et traité par l'acide chlorhydrique. On filtre pour séparer l'acide urique, on neutralise avec l'ammoniaque et on ajoute de l'acide acétique. L'oxalate de calcium est recueilli sur filtre, séché et pesé.

La méthode de NEUBAUER

Cette technique fait traiter une grande quantité d'urine par le chlorure de calcium en présence d'ammoniaque ; on ajoute ensuite de l'acide acétique jusqu'à

légère réaction acide, et quelques gouttes de solution alcoolique de thymol pour éviter la fermentation. Après 24 heures de repos, le précipité est recueilli sur filtre et lavé. On traite ce précipité par une solution chlorhydrique chaude qui dissout l'oxalate de calcium. Cette solution est concentrée au bain-marie, puis additionnée d'un léger excès d'ammoniaque et finalement acidifiée par l'acide acétique. L'oxalate de calcium se reprécipite; au bout de quelques heures, on le recueille sur un filtre dont le poids de cendres est connu. Après lavages et séchage, on calcine, filtre et précipité au rouge blanc pendant 20 minutes.

Le poids de chaux obtenu, multiplié par 1,607 donnera le poids d'acide oxalique contenu dans la prise d'essai.

Cette méthode, en son temps, fut assez employée et assez critiquée, témoin les modifications de HOPPE SEYLER, FURBRINGER, CZAPEK.

La méthode de SCHULTZEN

Cette méthode ne diffère pas beaucoup de celle de NEUBAUER ; elle a été surtout utilisée sous la forme modifiée par ROSENBERG. L'urine est traitée par une solution de chlorure de calcium en milieu ammoniacal, puis fortement concentrée ; après addition d'alcool, on laisse au repos pendant 48 heures.

Le précipité recueilli est lavé à l'eau, l'alcool, et l'acide acétique, ce qui donne un oxalate de calcium souillé de sulfate, mais exempt de matières organiques. Finalement ce précipité est dissous dans l'acide sulfurique

étendu et dosé volumétriquement par une solution de permanganate de potasse N/10.

A partir de l'année 1900, le nombre des travaux sur l'acide oxalique va croissant ; un assez grand nombre de méthodes sont proposées. Nous allons les passer en revue dans l'ordre chronologique.

II. — LES MÉTHODES DE DOSAGE

Méthode de SALKOWSKI [73]

La méthode de SALKOWSKI, si elle n'est pas la première en date, représente cependant la première méthode de dosage de l'acide oxalique dans l'urine, ayant eu une réelle diffusion. Celle-ci est encore si grande que l'on trouve aujourd'hui cette technique dans tous les traités classiques d'analyses urologiques.

Son originalité réside en un épuisement de l'urine par l'éther, épuisement qui a pour but d'éliminer certaines substances interférentes que renferme l'urine.

L'urine non filtrée (500 cc.) est concentrée au 1/3, puis acidifiée par 20 cc. d'acide chlorhydrique et agitée à trois reprises avec 200 cc. d'un mélange de 9 volumes d'éther et d'un volume d'alcool.

Les solutions éthérées, séparées et filtrées sont distillées après addition de 10 à 15 cc. d'eau.

Le résidu aqueux, filtré après refroidissement, est légèrement alcalinisé par l'ammoniaque, puis précipité en milieu acétique par 1 à 2 cc. d'une solution de chlorure de calcium à 10/100.

Après 24 heures de repos, l'oxalate de calcium est

recueilli sur un filtre sans cendres, puis lavé, séché et calciné ; on pèse le résidu constitué par de la chaux.

Le poids trouvé, multiplié par 1,607 donnera la quantité d'acide oxalique anhydre renfermé dans la prise d'essai.

La méthode de SALKOWSKI a été utilisée par divers chercheurs, mais beaucoup, s'ils conservèrent le principe de l'épuisement par l'éther, modifièrent tel ou tel temps du dosage. Certaines modifications ont d'ailleurs été intégrées dans la technique dite de SALKOWSKI et rares sont les traités classiques qui donnent l'exposé original.

Méthode d'AUTENRIETH et BARTH [7]

La méthode de ces auteurs se rapproche par certains côtés de celle de SALKOWSKI. Ils emploient eux aussi l'épuisement par l'éther, mais ayant constaté que cet épuisement n'est pas quantitatif pour des solutions étendues d'acide oxalique, ils précipitent d'abord cet acide par addition de chlorure de calcium, et c'est ce précipité dissous dans un petit volume d'acide chlorhydrique qui est agité avec de l'éther.

L'urine (si possible, l'émission totale de la journée) est additionnée d'un excès de chlorure de calcium et d'ammoniaque jusqu'à réaction fortement alcaline. Après un repos de 18 à 20 heures, on fait passer sur un double filtre le liquide surnageant le précipité, puis le précipité lui-même. (Vérifier que le filtrat ne se trouble pas au bout de quelques heures).

Après lavages, le précipité est porté dans un bécher et

dissous dans aussi peu que possible d'acide chlorhydrique chaud. Cette solution est versée dans un flacon bouchant à l'émeri, puis agitée à 4 ou 5 reprises avec 150 à 200 cc. d'éther contenant 3/100 d'alcool.

Les solutions éthérées sont réunies, filtrées et soumises à la distillation après addition de 5 cc. d'eau.

Le résidu aqueux est décoloré au noir animal et filtré. Ce filtrat réduit à un volume de 3 à 5 cc. est additionné de chlorure de calcium, d'ammoniaque jusqu'à réaction fortement alcaline, puis d'acide acétique jusqu'à réaction légèrement acide.

Après une heure de repos, l'oxalate de calcium est recueilli, lavé, séché et calciné; la chaux vive obtenue est finalement pesée.

On peut aussi dissoudre le précipité d'oxalate de calcium dans l'acide sulfurique dilué et le doser par manimétrie.

*Modification de LUZZATO [54] à la méthode de
SALKOWSKI*

Peu après la publication du mémoire d'AUTENRIETH, LUZZATO, dans une étude critique de cette méthode et de celle de SALKOWSKI, s'efforce de réhabiliter cette dernière. Etudiant à la fois l'acide oxalique et l'acide oxalorique, il est partisan de l'épuisement direct de l'urine sans concentration ni précipitation préalable, mais il estime que les trois agitations conseillées par SALKOWSKI sont généralement insuffisantes. Il faut agiter jusqu'à ce qu'une nouvelle addition d'éther n'enlève plus aucune trace d'acide oxalique. Il lui faut pour cela réaliser en

moyenne 12 agitations ; il dit même être allé une fois jusqu'à 18.

Méthode d'ALBAHARY [1-2]

En 1903 ALBAHARY publie une méthode assez originale basée sur ce principe : l'oxalate de chaux est soluble dans un excès d'alcali et ne précipite plus par les sels de magnésium ajoutés à cette solution, il y a formation d'oxalate magnésio-alcalin soluble.

« La quantité d'urine des 24 heures est versée dans une capsule et additionnée de 50 cc. de $\text{CO}^3 \text{Na}^2$ à 10 pour 100. On porte au bain-marie et on concentre la liqueur jusqu'au tiers de son volume. On ajoute à ce moment 20 cc. d'un mélange contenant pour 100 : 10 parties de MgCl^2 et 20 parties de NH^4Cl ; on additionne de noir animal lavé aux acides ; on agite de temps en temps le liquide qui continue à se concentrer au bain-marie. Une heure après l'addition de ces substances, le volume du liquide étant réduit au quart environ du volume primitif, on filtre à la trompe sans laisser refroidir ; après avoir ajouté au filtrat de l'ammoniaque jusqu'à réaction fortement alcaline, on l'abandonne pendant douze heures. On jette alors sur un filtre simple et l'on ajoute au filtrat du CaCl^2 en petit excès et de l'acide acétique jusqu'à réaction faiblement acide. On abandonne de nouveau pendant douze heures dans un endroit tiède. Tout l'oxalate de chaux est alors précipité. On le recueille sur un petit filtre et l'on dose l'acide oxalique. Pour cela on peut suivre deux méthodes :

1° Dissoudre le précipité d'oxalate de chaux sur le

filtre même dans SO^4H^2 dilué et titrer le filtrat par une liqueur de MnO^4K ;

2° Calciner le filtre pour transformer l'oxalate de calcium en CaO et calculer l'acide oxalique correspondant ».

Modification de DAKIN [10] à la méthode d'AUTENRIETH et BARTH

DAKIN conseille d'opérer la précipitation de l'oxalate de calcium au sein de l'urine en s'aidant de la chaleur ; l'extraction étherée est faite dans un appareil à épuisement continu et l'éther employé ne contient pas d'alcool.

Critiques et modifications de MAC LEAN [55] à la méthode d'AUTENRIETH et BARTH

Plus tard MAC LEAN, sur l'initiative de SALKOWSKI, étudie et critique le procédé d'AUTENRIETH, il montre en particulier que l'acide oxalique n'est pas intégralement précipité par addition à l'urine de chlorure de calcium et d'ammoniaque. MAC LEAN propose une méthode pénible : évaporation à siccité de l'urine préalablement additionnée de chlorure de calcium et d'ammoniaque, lavage du résidu à l'alcool et à l'éther, puis dissolution dans l'acide chlorhydrique et épuisement par l'éther.

Critiques des méthodes précédentes par SALKOWSKI et MOZDZENSKI [75]

Dans une étude générale sur l'oxalurie faite surtout en utilisant la méthode de SALKOWSKI, ces auteurs s'ef-

forcent de réhabiliter la méthode d'AUTENRIETH. Ils insistent sur la nécessité, dans la méthode de SALKOWSKI, de pousser la concentration assez loin (au huitième ou au dixième) et de réaliser un nombre plus grand d'agitations (4, 5 ou davantage). Avec ces modifications la méthode devient pénible et demande environ 30 heures.

Méthode de A. MOREL et SARVONAT [64]

En 1912 le Congrès de Médecine de Paris comprend les rapports de LOEPER [51] et de LAMBLING [42] sur l'acide oxalique, l'oxalurie et l'oxalémie. D'autre part, paraissent cette même année un certain nombre de travaux de A. MOREL et SARVONAT, de SARVONAT et ROUBIER, ainsi que la thèse de SARVONAT [74].

Pour ne pas surcharger et compliquer cette énumération de méthodes, nous renvoyons à un autre chapitre l'étude des techniques n'intéressant pas le dosage de l'acide oxalique dans l'urine.

La technique de A. MOREL et SARVONAT consiste à ajouter à l'urine un réactif phosphotungstique jusqu'à ce qu'une nouvelle addition ne provoque plus de précipité. Le précipité est essoré et lavé avec de l'eau renfermant du réactif phosphotungstique.

Dans le filtrat, l'excès d'acide phosphotungstique est éliminé par neutralisation à l'ammoniaque suivie d'une légère acidification par l'acide sulfurique. On attend quelques heures pour donner au précipité de phosphotungstate d'ammoniaque le temps de se former, puis on centrifuge.

Le liquide clair est concentré au B. M. jusqu'à 50 cc.

puis alcalinisé par l'ammoniaque et additionné de chlorure de calcium et d'un excès d'acide acétique. Au bout de 24 heures, on recueille le précipité par centrifugation ; ce précipité représente l'oxalate de calcium chargé de quelques impuretés.

L'acide oxalique qu'il contient est dosé par décomposition à chaud en présence d'acide sulfurique pur. La réaction suivante a lieu :



On prive les gaz dégagés de CO^2 et d'eau et on dose l'oxyde de carbone suivant le principe d'A. GAUTHIER, en le faisant passer sur de l'anhydride iodique et recueillant l'iode mis en liberté sur du cuivre réduit. On détermine la perte de poids du tube à anhydride iodique ou plutôt l'augmentation de poids du cuivre.

Méthode de LOEPER et BECHAMP [50]

Cette technique, contemporaine de celle de A. MOREL et SARVONAT est basée sur le même principe de défécation.

On soumet l'urine à l'ébullition après l'avoir additionnée d'acide chlorhydrique ; on filtre ; le filtrat est traité par une solution de phosphotungstate de soude à 10 pour 100 jusqu'à complète précipitation ; on filtre à nouveau.

L'excès de réactif est éliminé par addition d'ammoniaque en maintenant cependant un milieu légèrement acide. Le phosphotungstate d'ammoniaque est séparé par filtration.

Le filtrat neutralisé par l'ammoniaque, additionné de

chlorure de calcium et acidifié par l'acide acétique est abandonné au repos pendant 12 à 24 heures.

Le précipité est recueilli sur filtre, puis lavé à l'eau bouillante et à l'alcool ; on vérifie que le dernier lavage à l'eau ne réduit pas le permanganate. Le dosage est terminé par manganimétrie.

Méthode de WEGRZYNOWSKI [86]

Cette méthode n'offre pas beaucoup d'originalité, nous retrouvons successivement l'extraction par agitation avec de l'éther, la filtration des solutions éthérées, la distillation de ces solutions, la précipitation par le chlorure de calcium et l'ammoniaque, enfin la pesée après calcination du précipité obtenu.

Méthode de A. BAU [8]

BAU, dans un important travail sur le dosage de l'acide oxalique dans les urines et dans les selles, critique les méthodes antérieures et propose une technique nouvelle.

De celle-ci nous retiendrons les deux nouveautés suivantes : Le réactif précipitant appelé par BAU « calcium acétique » est un mélange d'acétate de soude, de chlorure de calcium et d'acide acétique. Ce réactif est ajouté directement à l'urine dans les proportions d'une partie de réactif pour cinq parties d'urine.

Pour compenser l'oxalate de calcium qui reste en solution dans l'urine, BAU a déterminé un coefficient de correction du résultat final.

Cette technique ne dose que l'acide oxalique libre ; pour doser en même temps l'acide oxalurique, on sou-

mettrait au préalable l'urine à l'ébullition en milieu chlorhydrique.

*Critiques et Modifications de MISLOWITZER [62]
aux techniques de BAU et SALKOWSKI*

Reprenant la méthode de BAU au « calcium acétique », MISLOWITZER lui refuse le qualificatif donné par son auteur de « méthode la plus exacte pour le moment ». Très justement, il montre que la correction préconisée est arbitraire et surtout beaucoup trop élevée, atteignant, parfois dépassant, la quantité d'acide à doser.

Par ailleurs il s'efforce d'améliorer la méthode de SALKOWSKI en augmentant le nombre et la durée des agitations au moyen d'un appareil mécanique.

Méthode de DADLEZ et JANKOWSKA [9]

Cette méthode est encore, au moins dans sa première partie, une simple application de la technique de SALKOWSKI.

On évapore au demi 100 cc. d'urine, on ajoute 5 cc. d'acide chlorhydrique pur et agite cette solution dans une ampoule à décantation avec 40 cc. d'éther renfermant 4 cc. d'alcool.

Après décantation de l'éther, on renouvelle deux fois le même traitement.

Les solutions éthérées sont concentrées à un volume de 10 cc. environ, filtrées et additionnées de chlorure de calcium et d'ammoniaque, puis d'acide acétique jusqu'à réaction légèrement acide.

Le précipité d'oxalate de calcium est recueilli le lendemain sur un filtre sans cendres, on le sèche puis on le

calcine ; finalement la chaux est dissoute dans 0,5 cc. d'acide chlorhydrique et dosée colorimétriquement selon le procédé de LAIDLAW et PAYNE [41]. Pour cela on fait agir l'alizarine dans des conditions nettement déterminées, on isole un alizarinate de calcium cristallisé. Cet alizarinate est décomposé par l'acide oxalique, l'alizarine est dissoute dans l'alcool, puis la solution, amenée à un volume déterminé avec une solution d'ammoniaque, est comparée colorimétriquement avec une solution étalon d'alizarinate d'ammoniaque.

Techniques de KHOURI [29-31-32-33]

De 1923 à 1927 paraissent un certain nombre d'articles de KHOURI sur le dosage de l'acide oxalique dans l'urine et dans le sang. Le principe est encore l'épuisement par l'éther, mais la deuxième partie du dosage consiste à former entre l'acide oxalique et l'urée une combinaison de formule



un peu soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool amylique ou dans l'alcool éthylique à 95°. On ajoute une quantité connue d'urée, la détermination par gazométrie de l'urée non combinée à l'acide oxalique permet d'obtenir le résultat cherché.

Dans le premier temps, on traite l'urine, concentrée au quart et acidifiée, par l'éther alcoolisé. On fait trois opérations successives. On part, soit d'une quantité d'urine relativement forte (50 à 500 cc.) soit de 20 cc. seulement ; dans ce dernier cas on défèque au moyen du réactif phosphotungstique de SARVONAT et concentre après filtration.

Les solutions éthérées résultant des épuisements de l'urine sont évaporées à sec. Au résidu on ajoute un volume exactement mesuré (2 cc. généralement) d'une solution alcoolique d'urée (solution à 5/100 pour la première méthode, à 0,5/100 pour la microméthode). Après une trituration soigneuse le mélange est évaporé à sec au B. M., on l'épuise par l'alcool amylique qui dissout l'urée non combinée.

Ces solutions amyliques, centrifugées pour éliminer toute trace de précipité, sont à leur tour évaporées à sec, ainsi que par ailleurs, un volume connu de solution d'urée. Ces résidus sont dissous dans quelques centimètres cubes d'eau, et l'on dose dans ces solutions, l'urée au moyen de l'hypobromite de soude. La différence trouvée entre ces deux déterminations donne la quantité d'urée combinée à l'acide oxalique. Cette quantité multipliée par le rapport 90/120 donnera le poids d'acide oxalique contenu dans le volume d'urine traité.

Travaux de CH.-O. GUILLAUMIN [19-20]

Après les travaux de KHOURI il faut citer ceux de Ch.-O. GUILLAUMIN. Bien que cet auteur ait surtout en vue l'oxalémie, il précise les conditions à remplir par les techniques de microdosages de l'acide oxalique. Il rappelle un certain nombre de principes dont on ne saurait se passer dans l'élaboration de ces techniques. Nous ferons, dans la suite de ce travail de larges emprunts aux travaux de Ch.-O. GUILLAUMIN.

Travaux de LEULIER, VELLUZ et GRIFFON [49]

De même, nous reprendrons en détail la technique

préconisée pour le dosage de l'acide oxalique en solutions pures par LEULIER, VELLUZ et GRIFFON. Il importe, cependant d'en citer les points principaux, car divers auteurs s'en sont inspirés dans l'établissement de leurs méthodes.

Cette technique consiste à précipiter l'acide oxalique par l'eau de chaux saturée. Après 6 heures de repos, le précipité d'oxalate est enrobé de phosphate de chaux (formé par addition de phosphate d'ammoniaque) et centrifugé. On décante et lave deux fois le culot avec 1 cc. d'eau glacée chaque fois.

A ce précipité, on ajoute de l'acide sulfurique, du sulfate manganeux et 2 cc. d'une solution de permanganate à 0,3 pour 1.000 environ. Au bout de trois minutes on ajoute quelques gouttes d'une solution d'iodure de potassium. L'iode libéré est dosé par l'hyposulfite de soude en solution centinormale. Un dosage analogue est pratiqué sur le même volume de solution permanganique. La différence entre ces deux dosages permet d'obtenir la teneur de la prise d'essai en acide oxalique.

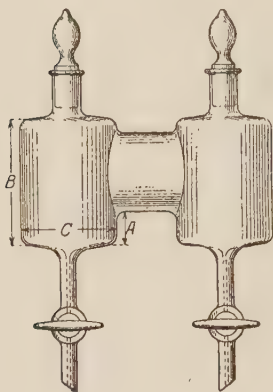
Cette méthode donne d'excellents résultats quand on l'applique aux solutions pures, mais elle ne convient pas aux milieux complexes, il faut au préalable isoler l'acide oxalique, le faire passer en solution pure ou, du moins, aussi pure que possible. C'est ce que divers auteurs se sont efforcés de faire tant pour l'urine que pour le sang.

Méthode de HOLMBERG [25]

En 1927 apparait en Allemagne une méthode dérivant encore de celle de SALKOWSKI, mais échappant aux

critiques d'épuisement insuffisant par l'éther. HOLMBERG applique au dosage de l'acide oxalique dans l'urine la méthode d'extraction par balancements de WIDMARK.

L'appareil de WIDMARK [87-88-89] est essentiellement constitué par deux ampoules à décantation à fond aussi plat que possible et réunies par une large communication. Cet appareil est monté sur un statif pouvant recevoir plusieurs ampoules analogues. Un petit moteur électrique anime le statif d'un lent mouvement d'oscillation (l'axe de cette oscillation étant perpendiculaire au plan de la figure).



Dans l'une des ampoules, on verse, après acidification, l'urine à extraire (50 cc.).

Dans l'autre, on place une solution de chlorure de calcium puis 350 cc. d'éther ordinaire (HOLMBERG après plusieurs auteurs nie l'utilité de l'alcool). L'éther recouvre complètement les deux liquides aqueux. L'appareil est mis en mouvement; par le balancement qui en résulte, l'éther est décanté d'une ampoule dans l'autre, sans que les liqueurs aqueuses puissent entrer en contact. L'acide oxalique passe de l'urine dans l'éther, puis de celui-ci dans la solution de chlorure de calcium où il se précipite à l'état d'oxalate de calcium. L'appareil subissant de part et d'autre de l'horizontale une inclinaison de 18° et la période complète du balancement étant

de 25 à 27 secondes, la durée de l'extraction doit être de 75 heures. Une augmentation de la vitesse des oscillations ne réduit pas notablement la durée de l'épuisement.

Quand l'extraction est terminée, on reçoit la solution de chlorure de calcium, tenant en suspension le précipité d'oxalate, sur un filtre en verre poreux, et on lave légèrement récipient et filtre avec de l'eau saturée d'oxalate de chaux. On dissout le précipité pouvant rester dans l'ampoule au moyen d'acide sulfurique à 40 pour cent chaud (trois fois 10 cc.); on fait passer ces solutions sulfurique sur le filtre, on les recueille quantitativement et il ne reste plus qu'à doser l'acide oxalique qu'elles renferment au moyen d'une solution centinormale de permanganate.

Méthode de MEYER ZU HORSTE [61]

KLEIN et WERNER [35] ayant montré que certains acides organiques sont susceptibles de se sublimer dans le vide à des températures assez différentes pour chacun de ces acides, MEYER ZU HORSTE utilise la propriété de l'acide oxalique de se sublimer à la température du bain-marie bouillant pour l'isoler de l'urine.

On traite 200 à 400 cc. d'urine par une solution de chlorure de calcium, en milieu ammoniacal, puis en milieu acétique. On recueille le précipité dans un tube à centrifuger spécial. On ajoute 3 à 4 cc. d'acide sulfurique normal, puis on adapte sur le tube un appareil rodé comportant d'une part un entonnoir, d'autre part un tube à dégagement horizontal relié à un réfrigérant. L'appareil plongeant jusqu'au dessus du rodage dans un bain-marie porté à une température voisine de 70°, on

fait le vide. Le liquide contenu dans le tube à centrifuger distille. Lorsque ce premier temps est terminé, on porte le bain-marie à l'ébullition (la pression étant maintenue voisine de 15 à 20 mm par le jeu du robinet). L'acide oxalique se sublime et vient se déposer sous forme d'une couche blanche dans la partie horizontale du tube à dégagement.

La sublimation terminée (ce qui demande environ 15 minutes) on isole le tube à dégagement et entraîne l'acide oxalique sublimé dans la fiole à vide qui a reçu l'eau condensée pendant le premier temps du dosage. L'acide oxalique est dosé dans cette solution par le permanganate.

Méthode de DODDS et GALLIMORE [12]

Un peu analogue est le procédé publié par DODDS et GALLIMORE, bien que ces auteurs ne semblent pas avoir eu connaissance du travail de MEYER ZU HORSTE.

L'acide oxalique est extrait du résidu sec provenant de l'évaporation de l'urine, par formation et distillation d'oxalate d'éthyle.

Le premier temps de la méthode consiste à réaliser un extrait parfaitement sec de l'urine. Dans un deuxième temps on éthérifie l'acide oxalique en traitant à chaud le résidu par de l'alcool tenant en dissolution du gaz chlorhydrique. Le troisième temps comprend la distillation de cet éther dans le vide; on le reçoit dans une solution de soude. L'excès de soude ou de sel de sodium empêcherait la précipitation correcte de l'oxalate de calcium, aussi on réalise un quatrième temps qui est l'épuisement continu par l'éther du liquide acidifié, dans

un appareil spécial. Dans un cinquième temps, la solution éthérée, additionnée de quelques centimètres cubes d'eau est distillée; la solution aqueuse résiduelle est traitée par l'eau de chaux selon LEULIER, VELLUZ et GRIF-FON [49]. Enfin l'acide oxalique est dosé dans le précipité par oxydation permanganique; selon la méthode de VAN SLYKE et SENDROY [83], on mesure le CO_2 formé au moyen de l'appareil manométrique de VAN SLYKE et NEILL [84].

Travaux et critiques de KAPELLER - ADLER et LAUDA [28]

En 1933, ces auteurs étudiant les acides éthéro-solubles de l'urine, sont amenés à doser l'acide oxalique : ils publient à nouveau quelques critiques du procédé de SALKOWSKI qu'ils choisissent cependant, en adoptant pour le dosage terminal la méthode oxydimétrique au lieu de la méthode pondérale.

Méthode de MAUGERI [56]

Cette technique est l'application à l'urine de la méthode de MERZ et MAUGERI [59] pour le dosage de l'acide oxalique dans le sang.

L'urine (5 cc.) est traitée par un égal volume de solution trichloracétique qui précipite éventuellement l'albumine et met en solution tout l'acide oxalique. Le filtrat est additionné de chlorure de calcium et d'acétate de soude, puis abandonné 12 heures à la glacière.

Ce temps écoulé, on ajoute un solution de chlorure de baryum; le précipité barytique formé permet de rassembler et de retenir facilement par centrifugation l'oxa-

late de calcium. On lave deux fois à l'eau distillée et on termine le dosage par oxydation permanganique, l'excès de permanganate étant déterminé par iodométrie.

Travaux d'ATHANASIOU et REINWEIN [6]

Ces auteurs étudiant le métabolisme de l'acide oxalique, emploient en ce qui concerne l'urine une méthode inspirée de celle de DODDS et GALLIMORE et de celle de LEULIER, VELLUZ et GRIFFON. L'acide oxalique est extrait de l'urine évaporée à sec, par formation et distillation d'oxalate d'éthyle. Cet ester est ensuite saponifié, l'acide oxalique libéré est extrait de sa solution aqueuse par l'éther, on distille cette solution éthérée et on réalise sur le résidu un dosage manganimétrique selon la méthode préconisée par LEULIER VELLUZ et GRIFFON.

Méthode de K. KOCK [36]

Cette méthode se rapproche un peu de celle de MAUGERI bien que K. Kock adresse à cet auteur des critiques assez sévères.

La technique débute par la défécation de l'urine (20 cc.) au moyen d'acide trichloracétique (2 cc. généralement). Cette défécation se fait à la température de 60 à 65°.

On place une partie du filtrat correspondant à 10 cc. d'urine dans un tube à centrifuger, on ajoute 1 cc. d'acide oxalique N/50, du rouge de méthyle, de la lessive de soude pour alcaliniser, de l'acide acétique jusqu'à réaction acide, de l'acétate de calcium et finalement de la soude jusqu'au virage au jaune (pH 6 environ)

Après une nuit de repos, le précipité est recueilli par

centrifugation, puis lavé avec une solution d'acétate de lithium chargée d'éliminer l'acide urique entraîné, et avec de l'ammoniaque très diluée (0,5/1.000).

Le dosage est terminé par manganimétrie à froid selon une technique analogue à celle de LEULIER VELLUZ et GRIFFON.

Du résultat obtenu, on retranche 2 cc. de permanganate N/100 qui représentent l'acide oxalique ajouté.

Méthodes utilisant le chlorure de cérium

Nous verrons à propos des dosages d'acide oxalique dans le sang que Izumi [26] puis Suzuki [78] ont proposé une technique de précipitation de l'acide oxalique par les sels de cérium.

En 1937 un autre savant japonais Oikawa [66] a donné une technique applicable à l'urine.

Méthode de FLASCHENTRAGER et MULLER [14]

Ces auteurs ont publié en 1938 un important mémoire sur l'acide oxalique. On y trouve une technique s'appliquant au sang et à l'urine.

En ce qui concerne l'urine on part de 10 cc. de liquide que l'on introduit après acidification dans un micro-appareil à extraction. Cet appareil spécial permettrait d'extraire 100/100 de l'acide oxalique en une heure de temps.

Le résidu de distillation de l'éther, porté à une température de 90 à 95° est additionné de chaux solide. Le précipité obtenu après 9 heures de repos est recueilli et lavé avec de l'alcool saturé de chaux.

On fait passer dans un appareil spécial le précipité

dissous au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique dans l'alcool éthylique. Puis on réalise dans cet appareil la formation et la distillation d'oxalate d'éthyle.

Cet oxalate est saponifié, puis l'acide oxalique est reprécipité à l'état de sel de calcium et finalement dosé par le permanganate N/100.

Au résultat obtenu on fait subir une correction déterminée par l'essai des réactifs, puis une deuxième correction représentant les pertes inévitables au cours du dosage, pertes évaluées pour 10 cc. de liquide et pour les réactifs employés à 0,008 milligrammes.

Méthode de PAGET et BERGER [67-68-69]

Ces auteurs proposent une réaction colorée de l'acide oxalique qui serait très spécifique et très sensible. Le principe est le suivant : réduction de l'acide oxalique par le zinc en milieu acide, caractérisation de l'acide glyoxylique formé par la coloration rouge obtenue après addition de chlorhydrate de phénylhydrazine et d'un oxydant (qui a été le ferricyanure et qui est devenu, dans leur technique la plus récente l'eau oxygénée).

Dans leur mémoire à l'Académie des Sciences [69] PAGET et BERGER donnent comme technique :

« Ajouter à 2 cc. de solution oxalique 1 cc. d'acide chlorhydrique N et une lame de zinc pur. (Cette lame doit répondre à des conditions très strictes pour que la réaction soit régulière). Agiter le mélange pendant 30 minutes, par exemple au moyen d'un agitateur mécanique type réaction de KAHN (278 agitations par minute). Placer 2 cc. de liquide réduit dans un tube Pyrex, y ajouter deux gouttes de chlorhydrate de phénylhydrazine à

1/100, porter au bain-marie bouillant pendant deux minutes et refroidir sous un courant d'eau, ajouter ensuite 1,8 cc. d'acide chlorhydrique concentré et deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes, agiter et laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant 10 minutes. On peut comparer au colorimètre la coloration obtenue avec celle donnée par une solution témoin. »

Cette réaction permettrait de déceler 1/200 de milligr. d'acide oxalique. Son intensité est, dans certaines limites, proportionnelle à la quantité d'acide oxalique mise en œuvre ; elle se prête au dosage colorimétrique de l'acide oxalique pour des concentrations allant de 5 à 70 milligr. par litre.

Son application à l'urine ou au sang est possible si l'on peut isoler au préalable l'acide oxalique en solution pure ; par exemple en le précipitant à l'état d'oxalate de calcium et en le mettant ensuite en solution chlorhydrique. PAGET et BERGER à notre connaissance, n'ont pas encore donné les détails précis d'utilisation de leur méthode dans les milieux biologiques.

CHAPITRE II

Travaux antérieurs concernant l'acide oxalique du sang normal

Les travaux concernant l'oxalémie sont basés sur des principes identiques à ceux utilisés pour l'oxalurie. Mais la détermination du taux de l'acide oxalique sanguin est délicate, à tel point que ce taux n'est pas connu de façon certaine. C'est GAROD qui, en 1849, signale pour la première fois la présence d'acide oxalique dans le sang. LOEPER [51], en 1912, lance le mot d'oxalémie déjà cité timidement par LECOEUR [47].

Vers la même époque LOEPER et BECHAMP [50], d'une part, MOREL et SARVONAT [64], de l'autre, publient des méthodes de dosage de l'acide oxalique dans le sang.

Méthode de LOEPER et BECHAMP [50]

C'est, au moins dans son début, la technique décrite par ces mêmes auteurs pour l'urine. Elle comprend :

a) Extraction par HCl à 1 pour 100. Défécation par le molybdate d'ammoniaque et précipitation par H^2S du molybdate en excès, puis évaporation du liquide ;

b) Neutralisation par l'ammoniaque, précipitation par un excès de CaCl^2 en présence de phosphate acide de soude, centrifugation du précipité, puis dessiccation ;

c) Décomposition par l'acide sulfurique, à la trompe à mercure. Extraction des gaz, dosage du CO formé tantôt par combustion eudiométrique, tantôt par l'indice iodique suivant la technique de NICLOUX.

Il existe une autre technique utilisant comme agent défécant le phosphotungstate de soude dont on élimine l'excès par l'ammoniaque.

D'après LOEPER il faut employer une prise d'essai au moins égale à 50 cc. de sérum sanguin et malgré cela l'oxalémie normale est considérée par lui comme impondérable.

Méthode de MOREL et SARVONAT [64]

C'est à peu près la méthode proposée par ces auteurs pour l'urine.

On traite le sang par dix parties d'eau, puis on défèque cette dilution par un réactif phosphotungstique. Après élimination de l'excès de réactif par l'ammoniaque et concentration de la solution, on précipite l'acide oxalique par le chlorure de calcium. L'oxalate calcique est décomposé par l'acide sulfurique; on dirige l'oxyde de carbone formé sur de l'anhydride iodique porté à la température de 120° et l'iode libéré est fixé sur du cuivre réduit. L'augmentation de poids du tube à cuivre permet de calculer la teneur du sang en acide oxalique.

Cette technique comme la précédente est difficilement applicable au sang humain, car elle semble nécessiter des prises d'essai tout à fait hors de proportion avec

celle que l'on peut prélever sur un malade. (La technique n'indique pas le volume minimum de sang à traiter).

MOREL et SARVONAT reconnaissent parfaitement que dans les conditions habituelles de la clinique « la proportion d'acide oxalique que l'on peut rencontrer est à peine de l'ordre du dixième de mgr. et que les variations à moins d'être énormes ne peuvent pas être appréciées ».

Méthode de LOEPER et TONNET [52]

En 1924 LOEPER publie avec son collaborateur TONNET une nouvelle méthode de détermination de l'oxalémie.

« La plus grande quantité possible de sérum (30 cc. au minimum) est étendue de deux fois son volume d'eau distillée. On ajoute dix gouttes d'acide chlorhydrique et on porte à l'ébullition. Dans la liqueur encore chaude on ajoute 10 cc. d'acide trichloracétique 1/5. Un abondant précipité se forme. Après avoir laissé refroidir, on verse dans un flacon jaugé et on ajoute de l'eau distillée jusqu'à 100 cc. On filtre et on recueille alors un volume V du filtrat qui est parfaitement limpide.

Ce volume de filtrat est mis dans un verre à expérience, neutralisé avec de l'ammoniaque, acidifié légèrement avec de l'acide acétique et additionné de 5 cc. d'une solution de chlorure de calcium à 10/100. On laisse reposer pendant 24 heures, il se forme un précipité d'oxalate de calcium. Celui-ci est jeté sur un filtre sans pli et lavé soigneusement avec de l'eau bouillante jusqu'à ce que l'eau de lavage n'ait plus d'action sur la solution de permanganate employée plus loin.

On arrose le filtre avec 10 gouttes d'acide chlorhydrique et on achève de dissoudre l'oxalate avec de l'eau

bouillante contenant 10 gouttes d'acide chlorhydrique. On dose l'acide oxalique dans la liqueur obtenue, au moyen d'une solution de permanganate N/10 en présence d'acide sulfurique. Chaque centimètre cube correspond à 0,0063 d'acide oxalique hydraté.

Il suffit de rapporter le volume du filtrat à 100 cc. pour avoir l'acide oxalique contenu dans la prise d'essai. »

Méthode de KHOURI [29-30-32-33-34]

La particularité des travaux de KHOURI est de supprimer la manganimétrie classique; on fait entrer l'acide oxalique en combinaison avec l'urée et on apprécie l'excès d'urée non combinée par un dosage à l'hypobromite de soude.

Le sérum (au moins 5 cc.) est désalbuminé par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique 1/5. On centrifuge et on traite un volume déterminé de liquide limpide par une quantité suffisante d'extrait de Saturne. Par centrifugation on sépare le précipité formé qui renferme tout l'acide oxalique, on le traite par 4 cc. d'acide sulfurique 1/10 puis on centrifuge à nouveau et décante le liquide limpide; cette opération est répétée avec 2 cc. d'acide sulfurique 1/10. Les solutions sulfuriques réunies sont agitées à trois ou quatre reprises avec le double de leur volume d'éther; l'acide oxalique passe dans l'éther. Les solutions éthérées sont distillées presque à siccité, le résidu est recueilli dans une capsule en verre de Bohême et évaporé au B. M. jusqu'à siccité. On y ajoute alors 2 cc. d'une solution alcoolique d'urée à 1/100, on mélange et on évapore à sec le tout au bain-

marie. Le résidu est épuisé par 10 cc. d'alcool amylique pur et chaud (qui dissout l'urée et non l'oxalate d'urée). Cette solution est centrifugée et le liquide limpide évaporé à sec au bain-marie. On dissout le résidu dans quelques centimètres cubes d'eau distillée et, dans cette solution aqueuse, on dose l'urée résiduelle par l'hypobromite de soude au moyen d'un uréomètre de précision.

On a évaporé en même temps 2 cc. de la même solution titrée d'urée; on dissout le résidu dans un peu d'eau distillée et l'urée est dosée dans cette solution comme il vient d'être dit.

La différence des poids d'urée obtenus par ces deux déterminations correspond à l'urée retenue par l'acide oxalique ; il suffit de multiplier ce chiffre par $9/12$ pour avoir la quantité d'acide oxalique contenue dans la prise d'essai.

Méthode de GUILLAUMIN [19-20]

« Si l'on possède suffisamment de sérum on mélange dans un tube à essai : sérum 20 cc., solution d'acide trichloracétique à 20/100 20 cc., une goutte d'alcool octylique ; on agite énergiquement et on filtre après trois minutes de repos jusqu'à l'obtention d'un liquide absolument limpide.

On prépare deux tubes en Pyrex de même poids et d'une même contenance d'au moins 30 à 35 cc., de forme cylindro-conique et d'une épaisseur (2 mm) leur permettant de supporter la centrifugation. Dans le premier marqué S on mesure 20 cc. de filtrat désalbuminé, dans le second 10 cc. de solution trichloracétique à 20/100

et 10 cc. de solution saline complexe ainsi composée :

Chlorure de sodium	8,5 gr.
Sulfate de potassium	0,46 gr.
Sulfate de magnésium crist.	0,25 gr.
Phosphate acide de sodium	0,15 gr.
Eau distillée q. s. pour	1000 gr.

On a préparé à l'avance une solution (renouvelée tous les 8 jours) d'acide oxalique à 0 gr. 10 (pesés grossièrement) pour 150 à 200 cc. d'eau distillée, dont on verse exactement 2 cc. dans chacun des tubes. On ajoute à chacun d'eux et dans l'ordre 0,5 cc. d'une solution de chlorure de calcium à 40/100, quelques gouttes de rouge de méthyle; puis en mélangeant avec un agitateur on verse de l'ammoniaque pure jusqu'à coloration vieux rose (environ $\text{pH} = 5$); si l'on a dépassé, l'on revient en arrière avec de l'acide acétique dilué, et on laisse reposer les deux tubes de préférence à la glacière pendant 12 heures.

Après ce temps, on frotte les parois du tube avec un agitateur garni de caoutchouc pour en détacher les cristaux et on rince l'agitateur avec quelques gouttes d'eau. Les deux tubes sont placés dans le centrifugeur le fond conique reposant sur un bain d'eau et la centrifugation est effectuée pendant 3 à 5 minutes à vitesse modérée. On décante l'eau-mère et on laisse s'essorer les tubes retournés, le bord en contact avec un papier filtre très propre. Après 2 ou 3 minutes, on essuie les bords des tubes, on délaye le précipité et on rince les parois d'un jet de pissette par 5 ou 6 cc. d'eau distillée; on centrifuge et on essore comme précédemment. Il ne reste plus qu'à ajouter dans chaque tube 3 cc. d'acide sul-

furique environ normal; on les porte au bain-marie bouillant pendant 1 à 2 minutes pour en élever la température à 80° et à l'aide de la même microburette on verse dans l'un et l'autre du permanganate centinormal jusqu'à coloration rose persistante.

Pour chacun d'eux, on déduit du volume trouvé celui ajouté en excès, en plaçant dans un tube identique un volume d'eau égal et en y versant du permanganate jusqu'à coloration identique.

Les corrections faites, on retranche du volume utilisé pour l'essai celui du témoin; la différence exprimée en centimètres cubes et multipliée par 45 donne le résultat en milligrammes d'acide oxalique anhydre par litre de sérum. »

Travaux de GUY LAROCHE et GRIGAUT [44]

En 1928 paraît de ces auteurs un article intitulé :

« Les modifications de la cholestérinémie chez les oxalémiques ». Les auteurs ne donnent que peu de détails sur la technique employée, ils disent simplement « Le dosage de l'acide oxalique est pratiqué sur le filtrat trichloracétique du sérum par précipitation à l'état d'oxalate de calcium suivie de titrage au permanganate en milieu sulfurique selon le procédé classique ».

Méthode de DOURIS et BECK [13]

On défèque le sang, le sérum ou les organes broyés, par addition d'un volume égal d'une solution d'acide chlorhydrique et d'acide trichloracétique (on part de 10 cc. de sérum). On centrifuge et on mesure un volume déterminé de liquide clair auquel on ajoute de l'am-

moniaque jusqu'à odeur persistante et un volume déterminé de solution 1/10 d'acétate de calcium.

Après une demi-heure de repos, le précipité est rassemblé par une centrifugation de 10 minutes. On le dissout dans une quantité juste suffisante d'acide chlorhydrique pur ; la solution obtenue est généralement limpide (sinon on la filtrerait) on y ajoute 1 cc. d'eau et 1 cc. de solution d'acétate d'ammoniaque. Au bout d'une heure le précipité est recueilli par centrifugation, on décante et on lave avec 5 cc. d'eau. Finalement, le précipité est dissous dans l'acide sulfurique N/20 et titré au moyen de permanganate N/100.

Méthode de MERZ et MAUGERI [59]

Tenant compte des observations de HEUBNER et GADAMER sur la valeur des épuisements par l'éther, des remarques de GUILLAUMIN [19-20] et de LEULIER VELLUZ et GRIFFON [49] sur la précipitation de l'oxalate calcique MERZ et MAUGERI apportent une double contribution à l'étude de l'acide oxalique du sang.

Dans une première partie de leur travail, opérant sur 6 litres de sang de bœuf, ils isolent un précipité qui au microscope présente la forme typique des cristaux d'oxalate de calcium. Résultat qui leur permet d'affirmer que l'acide oxalique bien qu'existant peut-être à un taux minime, est un constituant normal du sang de bœuf.

Dans une deuxième partie, ces auteurs apportent une technique de dosage de l'acide oxalique dans le sang, ne nécessitant pas plus de 5 cc. de sérum.

Le sang ou le sérum est additionné d'un égal volume

de solution trichloracétique et filtré; dans un tube à centrifuger on met 5 cc. de ce filtrat, 2 cc. d'eau de chaux, deux gouttes de solution de rouge de méthyle et de la lessive de soude jusqu'à disparition de la teinte rouge. Après 12 heures de repos à la glacière, on ajoute 0,5 cc. de solution de sulfate de magnésie à 0,5/100 et encore une ou deux gouttes de lessive de soude. On centrifuge, décante et lave deux fois le précipité avec 1 cc. d'eau chaque fois. Le résidu est additionné de 0,5 cc. d'acide sulfurique 1/5, de deux gouttes de solution de sulfate manganéux et de 2 cc. exactement mesurés de permanganate N/100 ; au bout de 3 minutes, l'excès de permanganate est titré par addition d'une solution d'iodure de potassium et dosage de l'iode libéré au moyen d'hyposulfite de soude N/100. Par différence on a le volume de permanganate employé ; ce volume multiplié par 0,45 donne en milligrammes l'acide oxalique présent dans la prise d'essai.

Cette technique a eu un certain retentissement dans les pays de langue allemande et en Italie. Elle a fait l'objet de divers travaux de MAUGERI [57-58] de JURGENS et SPEHR [27] de SCHULER et RENNKAMP [76] de MONTARIOL [63].

Méthode de TONNET [82]

TONNET donne en 1933 une nouvelle technique tenant compte de certaines observations faites par GUILLAUMIN [19-20] en 1927.

On part de 25 cc. de sérum que l'on défèque en les traitant par l'acide trichloracétique et quelques gouttes d'acide chlorhydrique 1/10 à l'ébullition pendant 5 minutes. L'acide chlorhydrique et l'ébullition ayant pour

but de décomposer plus sûrement les associations acide oxalique-protéines. On prend deux gros tubes à centrifuger; dans le premier on met 30 cc. de filtrat (correspondant à 15 cc. de sérum) et 1 cc. de solution d'acide oxalique à 1/1.000 ; dans le second on met 15 cc. de solution saline complexe de GUILLAUMIN, 10 cc. de solution trichloracétique, 1 cc. de solution d'acide oxalique 1/1.000 et 5 cc. d'eau. Chaque tube reçoit en outre une goutte de solution de rouge de méthyle, 1 cc. de solution de chlorure de calcium à 10/100, de l'ammoniaque puis, s'il y a lieu de l'acide acétique à 1/10 jusqu'à coloration rose vineux (pH 5 environ).

Après un repos de 12 heures on centrifuge les deux tubes, les précipités sont lavés avec 10 cc. d'eau distillée puis on met dans chaque tube 5 cc. d'acide sulfurique 1/5 pour dissoudre l'oxalate calcique et libérer l'acide oxalique. Un troisième tube est préparé, on y met 5 cc. d'acide sulfurique 1/5. Puis dans les trois tubes on ajoute 5 cc. très exactement mesurés d'une solution N/100 de permanganate. Après un contact à froid de 15 minutes au moins (la liqueur doit rester colorée en rose, sinon on ajoute à nouveau 5 cc. de solution de permanganate), on introduit dans chacun des trois tubes 5 cc. d'une solution de sulfate ferreux ammoniacal : les liqueurs se décolorent totalement. Au moyen d'une microburette, on laisse tomber goutte à goutte dans chaque tube du permanganate N/100 jusqu'à légère coloration rose. La différence entre le nombre de centimètres cubes employé pour les tubes 1 et 2 représente l'acide oxalique de la prise d'essai. Le tube 3 a un rôle de vérification qui ne paraît pas très nécessaire.

Modifications de la méthode de MERZ et MAUGERI

ATHANASIOU et REINWEIN [6] dans un travail sur le métabolisme de l'acide oxalique utilisent pour doser cet acide dans le sang la technique de MERZ et MAUGERI. Il font quelques critiques à la méthode, en particulier en ce qui concerne la précipitation de l'oxalate calcique en milieu fortement alcalin.

En 1935 KOPPLEN [38] apporte à son tour quelques modifications à cette méthode de MERZ et MAUGERI. Le filtrat trichloracétique est neutralisé par l'ammoniaque jusqu'à virage au jaune du rouge de méthyle; on concentre ensuite le liquide à 0,3 cc. puis on ajoute une goutte d'acide acétique et trois gouttes de solution saturée de chlorure de calcium.

Méthodes utilisant le chlorure de cérium

En 1933 IZUMI [26] propose une méthode utilisant la précipitation de l'oxalate de cérium à pH 2,3 au lieu de la précipitation de l'oxalate de calcium qui se fait à un pH plus élevé (pH 5 env.)

On part de 4 cc. de sang ou de sérum que l'on dilue de son volume d'eau et que l'on défèque par 2 cc. de solution d'acide trichloracétique; après 30 à 60 minutes de repos, on filtre. On place un certain volume de filtrat dans un tube à centrifuger spécial et on ajoute quelques gouttes de solution de chlorure cérique à 0,25/100. Après 30 à 60 minutes le précipité est recueilli par centrifugation, on lave à l'eau deux fois, puis on dissout le précipité dans 5 cc. d'acide sulfurique N. Le tube est porté à la température de 70 à 80° et l'on fait arriver du permanganate N/100 jusqu'à coloration rose.

Peu de temps après, un auteur également japonais SUZUKI [78] reprend la méthode au chlorure de cérium et après quelques modifications de détail l'utilise à divers travaux.

SUZUKI [80] défend sa méthode quelques années après en réponse aux véhémentes critiques de THOMSEN [81]. Il précise en particulier les concentrations que l'on doit adopter pour la solution de chlorure de cérium si l'on veut éviter des pertes importantes (l'oxalate cérique étant notablement soluble dans un excès de chlorure de cérium). D'autre part la récolte du précipité d'oxalate de cérium s'étant avérée délicate (impossible d'après THOMSEN) SUZUKI insiste sur la nécessité d'employer des tubes à centrifuger munis de diverticules particuliers.

Critiques et méthodes de THOMSEN [81]

En 1935 paraît un important mémoire de THOMSEN, nous y trouvons une étude critique approfondie de la méthode de MERZ et MAUGERI [59] et des méthodes au chlorure de cérium (SUZUKI [78] IZUMI [26])

Contrairement à beaucoup d'auteurs, THOMSEN a établi des techniques permettant de traiter des volumes importants de sang. Pour éviter la dilution qu'impose la défécation trichloracétique, il a adopté une défécation par les sels neutres (sulfate de soude ou sulfate d'ammoniaque). L'acide oxalique est extrait du filtrat en utilisant la méthode des balancements de WIDMARK [87-88-89]. Le dosage se termine par précipitation d'oxalate calcique, manganimétrie et iodométrie.

THOMSEN a d'abord pratiqué des épuisements sur des volumes de l'ordre de 50 cc. de filtrat (volume maxi-

mum que lui permettaient ses appareils). La plupart de ses résultats étant négatifs, il a totalisé les extractions de 1.600 cc. de filtrat et y a déterminé le taux d'acide oxalique.

Méthode de FLASCHENTRAGER et MULLER [14]

On part de 20 cc. de sang ou de sérum ; la désalbumination se fait au moyen d'une solution concentrée de chlorure de sodium, bichlorure de mercure et acide chlorhydrique; dans le filtrat le mercure doit être éliminé par le sulfure d'ammonium. La suite des opérations se poursuit comme dans le cas de l'urine.

CHAPITRE III

Résultats apportés par les auteurs

Nous avons réuni sous forme de tableaux les résultats obtenus par les auteurs dont nous venons de citer les méthodes ; nous y avons ajouté quelques chiffres trouvés au moyen de ces mêmes méthodes par d'autres auteurs.

Tous les résultats sont rapportés à 1.000 cc. et exprimés en milligrammes. Ils représentent des moyennes ou des chiffres extrêmes.

I. — ACIDE OXALIQUE URINAIRE

Auteur	Méthode employée	Prise d'essai	Acide oxalique par litre		Acide oxalique par 24 heures	
			moyenne	chiffres extrêmes	moyenne	chiffres extrêmes
FURBRINGER	NEUBAUER modifiée	Urines des 24 h.				20
SCHULTZEN	SCHULTZEN	Urines des 24 h.				0 70
SALKOWSKI [73]	SALKOWSKI	500 cc.	13,6		20,5	
AUTENRIETH [7]	AUTENRIETH	Urines des 24 h.				10
LUZZATO [54]	SALKOWSKI modifiée	200 cc.	6			20
ALBAHARY [1-2]	ALBAHARY	Urines des 24 h.			15	— 58 —
MAC LEAN [55]	SALKOWSKI	500 cc.	16,64			
	AUTENRIETH	500 cc.	12,44			
SERKOWSKI [75]	SALKOWSKI	500 cc.		6 50		
WĘGRZYŃSKI [86]	WĘGRZYŃSKI	500 cc.				18,3 19,4
BAU [8]	BAU	non précisée	14,3			
MISŁOWITZER [62]	SALKOWSKI modifiée	500 cc.		18,1 29,7		

Auteur	Méthode employée	Prise d'essai	Acide oxalique par litre		Acide oxalique par 24 h.	
			moyenne	chiffres extrêmes	moyenne	chiffres extrêmes
HOLMBERG [25]	HOLMBERG	50 cc.		21,20 56,80		23,3 43,5
MEYER ZU HORSTE [61]	MEYER ZU HORSTE	200 cc. à 400 cc.		4,7 19		
DODDS et GALLIMORE [12]	DODDS et GALLIMORE	25 cc.		15,6 22,4		
KAPPELER- ADLER [28]	SALKOWSKI modifiée	500 cc.				6,84
MAUGERI [56]	MAUGERI	5 cc.		60 90		
ATHANASIOU [6]	DODDS et GALLIMORE	25 cc.				24 27
K. KOCH [36-24]	K. KOCH	20 cc.				10 30
FLASCHENTRAGER [14]	FLASCHENTRAGER	10 cc.				20 45
SHOSUKE- OIKAWA [66]	SHOSUKE-OIKAWA	2 cc.				25 73

II. — ACIDE OXALIQUE DANS LE SÉRUM SANGUIN DE L'HOMME NORMAL

Auteur	Méthode employée	Prise d'essai	Acide oxalique par litre en milligrammes	
			moyenne	chiffres extrêmes
LOEPER [51]	LOEPER BECHAMP	50 gr.	inférieure à 10	5 15
LOEPER [52]	LOEPER TONNET	30 cc.		
GUILLAUMIN [19]	GUILLAUMIN	30 cc.	inférieure à 2	40
LAROCHE et GRIGAUT [44]	non précisée	non précisée		20 30
MERZ et MAUGERI [59]	MERZ et MAUGERI	5 cc.		28 52
MAUGERI [57-58]	MERZ et MAUGERI	5 cc.		

Auteur	Méthode employée	Prise d'essai	Acide oxalique par litre en milligrammes	
			moyenne	chiffres extrêmes
SCHULER [76]	MERZ modifiée	5 cc.		20 50
JURGENS [27]	MERZ	5 cc.	74	52 97
ATHANASIOU [6]	MERZ modifiée	5 cc.	37,7	28,4 57,2
KOPPLIN [38]	MERZ modifiée	5 cc.	14	
SUZUKI [78]	SUZUKI	4 cc.		30 40
MONTARIOL [63]	MERZ	5 cc.	35	21,6 50,4
FLASCHENTRAGER [14]	FLASCHENTRAGER	20 cc.	2,1	

III. — ACIDE OXALIQUE DANS LE SÉRUM SANGUIN DE DIVERSES ESPÈCES ANIMALES

Méthode employée	Auteur	Prise d'essai	Espèce animale	Acide Oxalique par litre (mgr.)
MERZ et MAUGERI [59]	MERZ et MAUGERI	5 cc.	Bœuf	61 67
JURGENS [27]	MERZ	5 cc.	Chien	54 192
ATHANASIOU [6]	MERZ modifiée		Chien	13 39,6
THOMSEN [81]	THOMSEN	930 cc.	Bœuf	3,3
FLASCHENTRAGER [14]	FLASCHENTRAGER	20 cc.	Bœuf Mouton Porc Cheval	3,2 4,7 3 2,4
SUZUKI [79]	SUZUKI	4 cc.	Bœuf Porc Chien	de 13 à 39,6

Nous ne commenterons pas ces résultats pour le moment ; on ne peut s'empêcher toutefois de remarquer la discordance qui règne entre les résultats des auteurs, qu'il s'agisse de l'oxalémie ou de l'oxalurie.

CHAPITRE IV

Critiques des méthodes de dosage de l'acide oxalique

D'un point de vue général et à la lumière des recherches que nous avons poursuivies, il est possible d'envisager d'un point de vue critique, les techniques de dosage de l'acide oxalique que nous venons de résumer.

I. — METHODES INTERESSANT L'URINE

Il est un certain nombre de défauts communs à plusieurs méthodes sur lesquels nous nous arrêterons d'abord.

Les premiers auteurs qui ont dosé l'acide oxalique ont espéré le précipiter quantitativement en additionnant directement l'urine de chlorure de calcium. Ce procédé a été reconnu imparfait et cependant des auteurs assez récents y sont revenus. Cette manière de faire est défec-
tueuse car, quelle que soit la composition de l'urine, quel que soit le déféquant utilisé, il paraît impossible de précipiter quantitativement l'acide oxalique d'une solution qui en renferme 15 à 40 mgr. par litre, si l'on

songe que la solubilité de l'oxalate de calcium est de 8 à 10 mgr. par litre d'eau distillée, et peut atteindre 18 mgr. en présence de chlorure de calcium.

Par ailleurs, le chlorure de calcium, ou l'acétate de calcium, risquent, dans des conditions déterminées de dilution et de pH qui peuvent fort bien se réaliser au cours des dosages, d'amener la précipitation de citrate de calcium. Comme l'urine renferme des phosphates divers, est-ce que les auteurs ne précipiteraient pas du citrate de calcium lorsqu'ils font une précipitation directe ? Cette surcharge est une cause d'erreur tant pour la pesée que pour la manganimétrie.

D'autres auteurs ont cherché à séparer l'acide oxalique de l'urine de façon à le faire passer en solutions relativement pures et concentrées avant d'opérer la précipitation de l'oxalate de calcium. A la suite de SALKOWSKI [73] presque tous les chercheurs ont adopté, dans ce but, l'épuisement de l'urine par l'éther. Comme nous l'avons vérifié, l'éther extrait à peu près quantitativement l'acide oxalique de l'urine ou de ses solutions aqueuses, mais l'opération n'est pas sans longueur, ni difficulté. En particulier les trois agitations préconisées par SALKOWSKI sont nettement insuffisantes. Seules peuvent donner la meilleure garantie d'épuisement les méthodes basées sur des vérifications tant en solutions pures qu'en solutions complexes. Ces vérifications montrent, d'ailleurs, que l'extraction éthérée demande de longues heures.

Enfin et bien que cette critique s'adresse surtout aux dosages dans le sang, nous reprochons à certaines techniques de ne pas employer des prises d'essai suffisantes.

Ainsi, lorsque le dosage est terminé par pesée de la chaux provenant de la calcination de l'oxalate de calcium, le poids d'acide oxalique obtenu est déterminé en multipliant le poids de chaux trouvé par 1,607. Prenant le cas d'une urine normale renfermant 20 mgr. d'acide oxalique par litre, on voit que le poids de chaux obtenu et pesé ne sera que de 13 milligrammes pour une prise d'essai de un litre d'urine.

Nous allons passer en revue les principales méthodes proposées.

Procédés antérieurs à SALKOWSKI

Les anciens procédés de SCHULTZEN, NEUBAUER, nous paraissent aujourd'hui des plus critiquables. L'addition d'un sel de chaux directement à l'urine doit donner un rendement insuffisant en oxalate ; par ailleurs, il est vrai, le précipité d'oxalate doit se charger d'impuretés (SO^4Ca , matières organiques) qui faussent le dosage en sens contraire.

O. NICKEL, LOMMEL ont critiqué ces procédés à leur époque ; ce dernier auteur déclare que sur 100 parties d'acide oxalique introduites dans une urine artificielle, il en a perdu de 3 à 19 parties.

Techniques de SALKOWSKI [73] et d'AUTENRIETH [7]

Le procédé de SALKOWSKI [73] tel qu'il a été publié en 1900, présente un défaut capital ; l'extraction de l'acide oxalique par l'éther est insuffisante. Par la suite les collaborateurs de SALKOWSKI (LUZZATO [54], MAC LEAN [55]) ont plus ou moins implicitement reconnu

l'imperfection de cet épuisement et préconisé un plus grand nombre d'agitations en présence d'un volume d'éther accru.

LUZZATO en particulier dit avoir réalisé 18 épuisements pour priver d'acide oxalique une urine de chien. Malheureusement, ces modifications n'ont pas toujours été transcrites dans les traités d'analyse, et les chercheurs qui ont utilisé la technique de SALKOWSKI sans vérifications ont dû enregistrer de nombreux échecs.

Le procédé d'AUTENRIETH [7] contemporain du précédent pêche par un autre côté : l'acide oxalique de l'urine est précipité directement par addition de chlorure de calcium ; comme nous l'avons déjà dit, cette précipitation ne saurait être complète. MAC LEAN, d'ailleurs, a montré qu'après 18 heures de contact entre l'urine et le chlorure de calcium le filtrat obtenu après séparation de l'oxalate calcique renfermait encore 26/100 de l'acide oxalique urinaire. La suite de la méthode n'est pas moins critiquable.

Les auteurs qui ont comparé ces deux méthodes apportent des résultats contradictoires. MAC LEAN [55] a constaté des pertes considérables en appliquant la méthode d'AUTENRIETH. SERKOWSKI [75] au contraire déclare acceptables cette méthode et celle de SALKOWSKI, et constate en outre que la vieille méthode de SCHULTZEN donne des résultats comparables avec ceux de la méthode de SALKOWSKI. Aussi LAMBLING [42], en 1912, disait de ces deux procédés « que leur vérification n'est pas encore achevée et que, dans la discussion des résultats physiologiques fournis par ces deux méthodes, on ne devra tenir compte que des variations suffisamment amples ».

Technique d'ALBAHARY [1-2]

La méthode d'ALBAHARY repose sur des principes exacts, mais il paraît bien que leur application ne va pas sans pertes importantes (NEUBERG cité par LOEPER [51], SARVONAT [74]). Nous avons nous-même vérifié la méthode sur de l'urine additionnée d'un poids connu d'acide oxalique, nous avons constaté une erreur par défaut de plus de 30/100. Ces pertes paraissent dues, au moins en grande partie, au noir animal, qui, même après de nombreux lavages à l'acide chlorhydrique (les dernières liqueurs chlorhydriques étant vérifiées exemptes de calcium), retient énergiquement l'acide oxalique. Et cependant (SARVONAT [74]) « ALBAHARY, soit dans sa thèse, soit dans sa communication à l'Académie des Sciences en 1912 retrouve dans l'urine la totalité et même plus de l'acide oxalique prévu ; il faut bien admettre que les causes d'erreur par défaut sont en partie compensées par d'autres dont on ne peut prévoir la grandeur ».

*Techniques de A. MOREL et SARVONAT [64] et de
LOEPER et BECHAMP [50]*

La méthode de A. MOREL et SARVONAT repose sur des principes exacts, elle est assez longue et assez pénible.

Les vérifications ont été faites sur 100 cc. de solution renfermant 90 mgr. d'acide oxalique et sur 25 cc. de sang en renfermant la même quantité. Ces concentrations sont au moins trente fois plus fortes que celles de l'urine et infiniment plus élevées que celles du sang normal. A l'échelle biologique on ne pourra apprécier que

les variations très marquées ; c'est d'ailleurs ce que A. MOREL et SARVONAT déclarent en fin de texte.

A la méthode de LOEPER et BECHAMP, on reprochera surtout la précipitation de l'oxalate calcique qui est faite en solution trop étendue, il s'en suit des risques de perte. LOEPER semble d'ailleurs avoir abandonné cette technique.

Technique de BAU [8]

La discussion de cette méthode a été faite par MISLOWITZER [62] ; cet auteur a montré que l'acétate de calcium acétique ne donnait pas de résultats meilleurs que le chlorure de calcium ; il a montré en outre, que la correction proposée par BAU pour tenir compte de la solubilité de l'oxalate de calcium dans l'urine était arbitraire et souvent plus importante que le résultat brut lui-même. Dans ces conditions, la seule remarque que nous ajouterons, est que l'acétate de calcium utilisé comme agent précipitant peut engendrer, si la dilution est convenable, des erreurs par excès dues à la précipitation de citrate de calcium (l'acide citrique n'étant pas signalé à cette époque comme constituant normal de l'urine).

Méthodes de KHOURI [29-31-32-33]

Les méthodes de KHOURI comprennent d'abord un épuisement par l'éther ; cet épuisement paraît incomplet. Mais le plus gros défaut de cette technique est que les solutions éthérées doivent être évaporées à sec au bain-marie, avant d'être additionnées de solution alcoolique d'urée. Comme nous l'avons montré et comme nous l'avons constaté en essayant la technique de KHOURI,

cette évaporation, même effectuée avec soin, peut entraîner des pertes considérable par volatilisation de l'acide. Des prises d'essai comportant 4,5 mgr. d'acide oxalique en solution dans 10 cc. d'eau ont été traitées selon la méthode de KHOURI ; les résultats obtenus se sont montrés déficients de 8/100, 34/100, 70/100, 90/100. Nous reviendrons sur ce sujet à propos de l'oxalémie.

Méthode de HOLMBERG [25]

Cette méthode semble être à l'heure actuelle, parmi les techniques publiées, une des plus sûres. L'épuisement au moyen de l'appareil de WIDMARK [87-88-89] paraît rigoureux, sa durée de 75 heures se rapproche de celle que nous avons déterminée avec notre appareil à extraction.

On peut cependant reprocher à la méthode d'utiliser le chlorure de calcium pour précipiter l'acide oxalique extrait par l'éther, et de ne pas se préoccuper de l'élimination des pigments urinaires éthéro-solubles.

Quoiqu'il en soit, les vérifications apportées par HOLMBERG et les chiffres fournis pour des urines normales sont tout à fait concordants avec ceux que nous avons obtenus. Malheureusement, cette méthode, comme la nôtre, demande un temps fort long.

Méthode de MEYER ZU HORSTE [61]

Utilisant la volatilisation dans le vide de l'acide oxalique, MEYER ZU HORSTE obtient cet acide en solution suffisamment pure pour pouvoir le doser directement par le permanganate.

Avant d'en arriver à cette sublimation, cet auteur pré-

cipite l'acide oxalique de l'urine par addition de chlorure de calcium. Selon toute vraisemblance, cette précipitation est incomplète. D'ailleurs, les chiffres apportés par MEYER ZU HORSTE sont un peu faibles (4,25 à 19 mgr. par litre d'urine).

Méthode de DODDS et GALLIMORE [12] et méthode de FLASCHENTRAGER et MULLER [14]

DODDS et GALLIMORE utilisent l'isolement de l'acide oxalique par formation et distillation d'oxalate d'éthyle. Le principe est séduisant, mais la réalisation est assez compliquée. Car, à cette éthérification, doivent faire suite une saponification, une extraction par l'éther, la précipitation de l'oxalate de calcium et le dosage manométrique selon Van Slyke. Les résultats apportés par DODDS et GALLIMORE pour des urines normales et des urines additionnées d'acide oxalique sont satisfaisants.

Cette technique légèrement simplifiée paraît également avoir donné de bons résultats à ATHANASIOU et REINWEIN [6].

La méthode de FLASCHENTRAGER et MULLER [14] utilise une partie de celle de DODDS et GALLIMORE, mais elle est encore plus compliquée. Les résultats et les vérifications présentés sont très convenables, cependant, et nous y reviendrons pour le sang, la prise d'essai paraît trop faible ; en effet, la méthode, d'après ses auteurs, ne permet pas de déceler moins de 20 γ d'acide oxalique dans 10 à 25 cc. de solution ; 10 cc. d'urine en renfermant souvent moins de 200 γ ; donc dans ces cas (soit lorsque l'oxalurie sera inférieure à 20 mgr. par litre) le dosage sera entaché d'une erreur par défaut supérieure à 10/100.

Méthode de MAUGERI [56]

Cette méthode est séduisante en raison de sa simplicité, mais elle appelle de sérieuses critiques.

1° La précipitation directe de l'acide oxalique par addition de chlorure de calcium à l'urine déféquée par l'acide trichloracétique.

Cet acide élimine l'albumine urinaire s'il s'en trouve, fait passer en solution les oxalates insolubles, mais n'élimine pas les substances interférentes comme les acides organiques, les pigments... Par contre il a l'inconvénient de diluer l'urine au demi.

A 5 cc. de filtrat trichloracétique (correspondant à 2,5 cc. d'urine), on ajoute 1 cc. de solution de chlorure de calcium et 2 cc. de solution d'acétate de sodium. Ce volume de liquide serait susceptible de dissoudre 144 γ d'oxalate de calcium d'après GUILLAUMIN. On peut admettre que l'acétate de sodium s'oppose dans une certaine mesure à cette dissolution. Aussi nous prendrons comme solubilité de cet oxalate calcique, la solubilité dans l'eau distillée, soit 80 γ , pour les 8 cc. de liquide. Ceci revient à dire que dans 2,5 cc. d'urine nous avons à la base un déficit de 80 γ ; rapporté au litre d'urine ce déficit représente 32 mgr. d'oxalate calcique. Il semblerait que la plupart des urines ne doivent donner aucun précipité suivant cette technique.

Pour faciliter la récolte de ces précipités, on ajoute au mélange comprenant l'urine et le chlorure de calcium, du chlorure de baryum. Le précipité recueilli par centrifugation serait constitué en plus de l'oxalate calcique par du sulfate de baryte ou par d'autres sels de ba-

ryum sans action sur le permanganate. Comme preuve de cette affirmation MAUGERI déclare : « J'ai employé dans des expériences parallèles, d'une part une solution de chlorure de baryum à 1/100, d'autre part une solution à 5/100, ce qui évidemment donnerait des taux de substances organiques entraînées différents, j'ai toujours obtenu le même résultat ». Sans mettre en doute la rigueur de ces expériences parallèles, on peut supposer que la solution à 1/100 suffit à précipiter la totalité des substances organiques entraînables dans ces conditions, ce qui explique que la solution de chlorure de baryum à 5/100 ne donne pas un taux supérieur.

2° Le faible volume de la prise d'essai entraîne une autre critique. En effet, le volume de solution centinormale utilisée pour le titrage final sera extrêmement réduit. 1 cc. de permanganate N/100 correspond à 450 γ d'acide oxalique ; dans une urine normale renfermant 20 mgr. de cet acide par litre, nous n'aurons à titrer que 50 γ d'acide oxalique ; les 50 γ exigeront à peine plus de 0,10 cc. de permanganate. Or, il s'agit du titrage d'un précipité qui peut entraîner des substances facilement oxydables.

3° Les résultats et vérifications donnés par MAUGERI. Les résultats concernant les urines sont réduits à deux échantillons ; on peut le regretter, car il est curieux de constater que les deux urines citées possèdent les taux respectifs de 60 et 90 mgr. d'acide oxalique par litre taux exceptionnellement élevés.

Quant aux vérifications par la méthode des quantités ajoutées nous leur ferons deux reproches : les quantités

ajoutées (22 mgr./100 et 40 mgr./100) sont trop considérables par rapport à la teneur des urines considérées (6 et 9 mgr./100). Les erreurs trouvées sont minimales, mais pour transposer la vérification à l'échelle de l'urine véritable, il faut les multiplier par 8 ou 10. Ensuite et surtout, aucune vérification ne prouve que le précipité recueilli est bien exempt de matériaux réagissant sur le permanganate.

Méthode de KOCH [36]

KOCH, après avoir reconnu les défauts de la méthode de MAUGERI, s'est efforcée de les corriger. Elle part de 20 cc. d'urine et ajoute un volume de solution trichloracétique qui ne dépasse guère 2 cc. La dilution étant moins grande, les pertes sont sûrement moindres que dans la technique de MAUGERI. D'autre part la précipitation se fait en présence d'une quantité suffisante, mais minime de calcium, ce qui élimine toute chance de précipitation de citrate. Par contre la précipitation à pH 6 ou légèrement supérieur nous paraît devoir fournir avec l'oxalate de chaux diverses impuretés organiques dont certains pigments urinaires. Enfin il ne faut pas oublier que le dosage s'opère sur un volume correspondant à 10 cc. d'urine. En adoptant encore 20 mgr. comme oxalurie normale, c'est donc 0,20 mgr d'acide oxalique que l'on recueillera ; ces 0,20 mgr ne représentent que 0,45 cc. de solution de permanganate centinormale. L'addition d'une quantité connue d'acide oxalique en vue de rendre le précipité plus important, donne un complément de sécurité plutôt illusoire, ainsi que LEULIER l'a montré dans son article de 1929. Les quelques essais

réalisés en suivant cette technique n'ont pas été très encourageants, nous avons trouvé par rapport à notre méthode des différences énormes (8,75 au lieu de 23 mgr.) que nous attribuons pour une part importante aux décantations très difficiles à réaliser sans pertes.

Que conclure de cette étude critique des méthodes de dosage de l'acide oxalique dans l'urine ?

D'abord, qu'il n'y a pas de méthode à la fois simple, sensible et rigoureuse. Les seules techniques qui reposent sur des principes indiscutables et sur des vérifications acceptables sont celles de HOLMBERG [25], de DODDS et GALLIMORE [12] et peut-être celle de FLASCHENTRAGER et MULLER [14], encore que le faible volume de la prise d'essai doive augmenter notablement le pourcentage d'erreur.

Il faut reconnaître cependant que par une série de hasards heureux et compensateurs, les méthodes les plus différentes, même celles qui paraissent les moins rigoureuses donnent finalement des résultats qui se rapprochent des résultats classiques (surtout si l'on songe aux chiffres hétéroclites donnés pour l'oxalémie). A cela une explication, c'est que toujours par les mêmes hasards, les pertes dues à une extraction ou à une précipitation insuffisantes sont souvent compensées par une surcharge des précipités en matières organiques ou en sels organiques de calcium qui sont finalement comptés comme acide oxalique.

II. — METHODES INTERESSANT LE SANG

A de rares exceptions près, les méthodes proposées pour le dosage de l'acide oxalique dans le sang ou le sérum sanguin pèchent toutes par l'insuffisance de la prise d'essai.

En effet, à la suite des travaux de GUILLAUMIN [19], de THOMSEN [81], de FLASCHENTRAGER et MULLER [14] et par analogie avec ce que nous avons trouvé pour certaines espèces animales, il semble que l'on peut considérer l'oxalémie normale comme ne dépassant pas quelques milligrammes.

Les méthodes de dosage aboutissent à peu près toutes à un dosage manganométrique de l'acide oxalique ; or la sensibilité de ce dosage, même accrue par l'iodométrie n'est pas infinie. Nous montrerons plus loin que, pour arriver en solution pure à une erreur inférieure à 3/100, il faut faire la lecture d'un volume de solution de permanganate ou d'hyposulfite N/100 égal ou supérieur à 0,33 cc. Ces 0,33 cc. correspondent à 0,148 milligrammes d'acide oxalique ; il faudra donc avoir dans la prise d'essai un poids d'acide oxalique supérieur à 0,15 milligrammes. Si nous admettons pour le sang une teneur au plus égale à 5 milligrammes par litre, la prise d'essai qui renfermera 0,15 mgr. sera égale ou supérieure à 30 cc.

Par ailleurs nous verrons que l'oxalate de calcium a une solubilité dans l'eau voisine de 10 mgr. par litre (LEULIER) solubilité encore accrue par la présence de chlorure de calcium (GUILLAUMIN [19]). Dans ces conditions il est illusoire de chercher à précipiter cet

oxalate de calcium aux dépens d'un filtrat sanguin qui en renfermera moins de 5 milligrammes par litre.

L'extraction par l'éther, appliquée à ce filtrat exigera un temps fort long et à notre connaissance, seul THOMSEN [81], avant nous, a réalisé une extraction quantitative.

Malgré toutes ces causes d'erreur par défaut, nous devons constater que nombre d'auteurs donnent comme taux d'oxalémie normale des chiffres singulièrement élevés. Apparemment c'est que les techniques employées par eux n'aboutissent pas à un isolement spécifique de l'acide oxalique.

Nous allons passer en revue les principales méthodes proposées.

Méthodes utilisées par LOEPER et ses collaborateurs

La méthode publiée par LOEPER et BECHAMP [50] en 1912 opère la précipitation de l'oxalate calcique en solution relativement concentrée. Elle apprécie ensuite le taux d'acide oxalique dans le précipité obtenu, par formation d'oxyde de carbone ce qui est une réaction spécifique mais délicate.

En 1924 LOEPER et TONNET [52] publient une deuxième méthode qui opère la précipitation de l'oxalate calcique en solution très étendue, de plus ce précipité est recueilli sur un filtre, puis lavé à l'eau bouillante, toutes opérations bien risquées si l'on songe à l'importance minime du précipité que l'on peut recueillir.

Enfn, en 1933, TONNET [82] apporte un certain nombre d'améliorations à la méthode précédente. La méthode devient dès lors très voisine de celle de GUILLAUMIN.

Méthode de KHOURI [29-30-32-33-34]

GUILLAUMIN [19] reproche à la méthode de KHOURI de donner des résultats trop élevés. On peut se demander par quel mécanisme cette méthode donne de tels résultats ; les essais que nous avons réalisés en solution pure nous ont montré, au contraire, que par suite de l'évaporation à sec de l'extrait éthéré présumé oxalique, les résultats étaient constamment déficitaires. Il faut donc conclure à l'entraînement de substances inconnues.

Par ailleurs un uréomètre de précision permet d'apprécier sans erreur supérieure à 5/100, environ 2 milligrammes d'urée. Ces 2 milligrammes d'urée correspondent à 1,5 milligramme d'acide oxalique. Il faut donc disposer d'une quantité de sang renfermant au moins 1,5 milligramme d'acide oxalique. D'après KHOURI la prise d'essai peut être de 5 cc. de sang ; pour que l'on y trouve 1,5 milligramme il faudrait (sans tenir compte des pertes dues à la défécation) que l'oxalémie du sujet considéré soit de 300 milligrammes par litre. Si l'oxalémie n'était que de 5 milligrammes on trouverait entre les deux dégagements d'azote lus sur l'uréomètre une différence de l'ordre de un centième de centimètre cube. Etant donné le taux de l'oxalémie normale, cette méthode est inapplicable.

Méthode de GUILLAUMIN [19-20]

GUILLAUMIN a fait sur le microdosage de l'acide oxalique dans le sérum sanguin un certain nombre de remarques. La méthode qu'il propose tient justement compte de ces remarques. Elle tient compte aussi des

possibilités cliniques, et la prise d'essai ne dépasse pas 20 cc. de sérum. Dans ces conditions, il semble que GUILLAUMIN la considère un peu comme un pis aller, témoin sa conclusion : « J'ai constaté que l'oxalémie et l'oxalorachie normales sont actuellement non mesurables, c'est à dire inférieures à 2 milligrammes par litre de sérum ou de liquide céphalo-rachidien ».

Méthode de MERZ et MAUGERI [59]

Les taux d'oxalémie normale trouvés au moyen de cette méthode sont particulièrement élevés. ATHANASIOU et REINWEIN [6], THOMSEN [81] mettent en doute la spécificité de cette méthode. Ce dernier se demande si le précipité calcique et barytique ne renferme pas des substances organiques autres que l'acide oxalique et réagissant sur le permanganate. Il a étudié divers sérums à ce point de vue ; examinant au microscope les précipités obtenus, il n'a retrouvé qu'une fois les cristaux octaédriques typiques de l'oxalate de calcium cristallisé ; de plus il a constaté que, si l'on faisait agir le permanganate sur ces précipités pendant un temps assez prolongé, la quantité de permanganate consommé était nettement plus grande que si le temps de contact était réduit à quelques minutes ; ceci tendrait à prouver que l'acide oxalique n'est pas le seul constituant oxydable du précipité. Les vérifications par la méthode des quantités ajoutées que MERZ et MAUGERI apportent, paraissent satisfaisantes. En réalité si elles montrent que l'acide oxalique ajouté est retrouvé sans déficit et sans surcharge organique, elles ne prouvent pas que, dans le cas d'un sérum, le permanganate utilisé pour l'oxydation du précipité corres-

pond exclusivement à l'acide oxalique préexistant du sérum.

Nous nous rallions aux critiques de THOMSEN et nous signalons que la prise d'essai initiale ne permet pas d'atteindre une précision convenable. En effet, après défécation trichloracétique, cette prise se réduit à 2 cc. 5 ; même en prenant les valeurs d'oxalémie trouvées par MERZ et MAUGERI soit 20 à 30 mgr par litre, on ne trouve dans 2,5 cc. de sérum que 0,05 à 0,07 mgr. d'acide oxalique, ce qui représente à peu près 0,10 à 0,15 cc. de permanganate N/100.

Méthodes utilisant le chlorure de cérium [26-78]

Ces méthodes ont comme la précédente fait l'objet des critiques de THOMSEN [81]. En effet, si l'oxalate de cérium est moins soluble dans l'eau que l'oxalate de calcium (0,4 mgr. au lieu de 8 à 10 mgr. par litre d'eau distillée) et peut précipiter à pH 2,3, cet oxalate de cérium est extrêmement soluble dans un excès de réactif. D'après THOMSEN, il faut employer une quantité de chlorure de cérium très peu différente de la quantité théorique nécessaire pour précipiter tout l'acide oxalique de la solution. THOMSEN déclare n'avoir jamais pu obtenir aux dépens de filtrats sanguins la moindre précipitation par le chlorure de cérium. A cela SUZUKI [80] répond que le précipité est très difficile à rassembler et que la technique prévoit des tubes à centrifuger à diverticule spécial qui facilite la récolte de ce précipité. Par ailleurs THOMSEN critique dans la technique de SUZUKI le faible volume de la prise d'essai. Le dosage s'opère en définitive sur 3 cc. d'un filtrat de sang dilué au 1/3 soit donc sur 1 cc. de sang

ou de sérum qui, d'après ces mêmes auteurs japonais, ne renferme que 0,03 à 0,04 mgr. d'acide oxalique. THOMSEN se demande quelle méthode permet d'apprécier 0,03 à 0,04 mgr. d'acide oxalique (représentant moins de 0,10 cc. de permanganate N/100). SUZUKI omet dans sa réponse datée de 1936, de préciser l'exactitude de cette fin du dosage.

Méthode de THOMSEN [81]

Les résultats de THOMSEN pour les sérums animaux concordent avec les nôtres : la méthode suivie pour l'extraction éthérée est la méthode d'épuisement par balancement de WIDMARK qui doit donner toute garantie. Cependant le procédé employé pour déféquer le sang ne nous a pas donné de bons résultats, mais nos conditions d'expérience n'étaient pas rigoureusement les mêmes que celles de THOMSEN.

Méthode de FLASCHENTRAGER et MULLER [14]

Les résultats fournis par ces auteurs se rapprochent de ceux de THOMSEN [81], de Guillaumin [19] et des nôtres. Les vérifications qu'ils apportent sont très acceptables. Par contre leur méthode a l'inconvénient d'être compliquée et elle paraît dépasser les limites de la sensibilité que les auteurs eux-mêmes lui attribuent. En effet, la quantité de sang mise en œuvre est, après la défécation, seulement de 8,68 cc.; une telle quantité de sérum humain renferme, d'après les résultats de FLASCHENTRAGER et MULLER :

$0,0021 \times 8,68 = 0,0183$ mgr. d'acide oxalique soit 18,3 γ . La sensibilité de la méthode se situant d'après

ses auteurs autour de 20 γ , il faut s'attendre à ce que la plupart des sangs normaux fournissent des résultats négatifs.

De ce bref exposé résulte une indécision certaine sur le taux de l'oxalémie normale. On peut se demander si réellement l'acide oxalique existe dans le sang à un taux accessible aux dosages chimiques. Quant aux variations pathologiques, elles sont encore plus discutées ; certains comme GUILLAUMIN les déclarent minimales, d'autres comme KHOURI indiquent les valeurs énormes de 400 à 600 mgr. par litre.

Deuxième Partie

Recherches personnelles

Le dosage de l'acide oxalique peut se schématiser comme suit :

1) Extraction quantitative de l'acide à un état de pureté satisfaisant ;

2) Dosage pondéral, alcalimétrique, gazométrique ou manganométrique.

Nous avons utilisé ce dernier mode comme l'ont précisé LEULIER, VELLUZ et GRIFFON.

CHAPITRE PREMIER

Dosage de l'acide oxalique en solutions pures

A) PRÉCIPITATION DE L'OXALATE DE CALCIUM.

On peut dire que le dosage de l'acide oxalique repose presque toujours sur l'isolement de cet acide à l'état de sel de calcium. La solubilité de l'oxalate de calcium est en effet minime ; elle est négligeable dans les solutions contenant un excès d'oxalate alcalin ; elle est notable, par contre, lorsque l'oxalate de calcium se trouve en présence d'un grand excès d'eau distillée.

Cette question a préoccupé les chercheurs qui ont établi les méthodes de dosage de l'acide oxalique ou les méthodes de dosage du calcium (KOLRAUSCH [37], RICHARDS [71], MESTREZAT [60], GUILLAUMIN [19], LEULIER [49].

Ces auteurs indiquent comme solubilité de l'oxalate de calcium par litre d'eau distillée :

5,5	milligrammes	KOLRAUSCH	(18°)
6,8	—	RICHARDS	(25°)
8	—	GUILLAUMIN	
10	—	LEULIER, VELLUZ et GRIFFON	

Cette solubilité est d'ailleurs variable, en particulier certains ions la modifient. Il en est ainsi des sels de calcium utilisés comme agents de précipitation de l'acide oxalique.

Parmi eux le *chlorure de calcium* a été le plus utilisé. Il n'est cependant pas exempt de critiques. GUILLAUMIN [19] conclut à la suite de ses recherches sur les conditions de précipitation et de solubilité de l'oxalate de calcium, que le chlorure de calcium « produit deux effets dont l'intensité augmente avec le taux du sel présent dans la solution — un retard dans la précipitation — une augmentation de la solubilité qui peut passer de 8 mgr. à 18 mgr. d'acide oxalique par litre pour 0,40 grammes de chlorure de calcium dans 10 cc. de liquide » LEULIER VELLUZ et GRIFFON [49] arrivent aux mêmes conclusions que GUILLAUMIN ; des solutions titrées d'acide oxalique précipitées par le chlorure de calcium (concentration finale 4/100) leur ont donné un déficit de plus de 30/100 en oxalate de calcium. Selon ces auteurs il s'établirait l'équilibre suivant :



L'addition d'acétate de sodium provoque une amélioration des résultats (erreurs ramenées à — 8 ou — 15 %).

Nous avons repris les expériences de LEULIER VELLUZ et GRIFFON, nos conclusions ayant été identiques aux leurs nous avons renoncé au chlorure de calcium comme agent précipitant. Ci-dessous les résultats obtenus par LEULIER VELLUZ et GRIFFON et les nôtres (concentration finale du chlorure de calcium et de l'acétate de sodium, 4 pour 100)

Acide oxalique + chlorure de calcium

LEULIER, VELLUZ et GRIFFON			DORCHE		
Ac. oxalique en mgr. dans la prise		Erreur pour 100	Ac. oxalique en mgr. dans la prise		Erreur pour 100
Mis	Trouvé		Mis	Trouvé	
0,281	0,183	— 34,5			
0,253	0,165	— 34,8			
0,225	0,138	— 38,6	0,225	0,180	— 20
				0,171	— 24
0,197	0,124	— 37,1	0,45	0,337	— 25

*Acide oxalique + chlorure de calcium
+ acétate de sodium*

0,562	0,514	— 8,54			
0,506	0,440	— 13			
0,450	0,390	— 13,3	0,450	0,405	— 10
				0,396	— 12
0,393	0,362	— 8	0,225	0,189	— 16

L'acétate de calcium a été préconisé par BAU [8], les avantages paraissent intéressants, en effet l'acétate de

calcium est doué d'un certain pouvoir tampon. Nous avons essayé de précipiter des solutions pures d'acide oxalique par des solutions d'acétate de calcium. Les résultats assez bons, quoique moins réguliers que ceux obtenus avec l'eau de chaux, sont reproduits ci-dessous.

Acétate de Ca solution 5/100	Ac. oxalique employé mgr.	retrouvé Ac. oxalique mgr.	Erreur pour cent
0,20 cc.	0,225	0,216	— 4
	0,45	0,441	— 2
	0,90	0,882	— 2
		0,891	— 1
1 cc.	0,112	0,099	—12
		0,103	— 8
	0,225	0,211	— 6
		0,211	— 6
	0,45	0,441	— 2
	0,90	0,886	— 4
		0,868	— 4
	35,1	1,305	— 3
		1,305	— 3

La majorité des résultats apparaît satisfaisante, toutefois les erreurs assez fortes constatées dans certains cas dépassent la limite généralement admise.

L'eau de chaux est l'agent de précipitation préconisé par LEULIER VELLUZ et GRIFFON [49]. Elle apporte uniquement le cation Ca nécessaire à la formation d'oxalate de calcium. Elle peut aussi neutraliser les acides qui se trouveraient aux côtés de l'acide oxalique. Enfin

L'oxalate de calcium est moins soluble dans l'eau de chaux saturée que dans l'eau distillée (7 mgr. par litre d'eau de chaux, au lieu de 10 mgr. par litre d'eau distillée, LEULIER). C'est l'eau de chaux que nous avons adoptée pour ce travail.

L'eau de chaux saturée renferme des quantités de calcium comprises entre 0,80 gr. et 0,90 gr. par litre ; si l'on veut assurer la précipitation de solutions oxaliques renfermant des quantités égales et inférieures à un milligramme (exigeant donc au moins 0,44 mgr. de Ca) on prendra 1 ou mieux 2 cc. d'eau de chaux (qui fourniront 0,80 mgr. et 1,6 mgr. de Ca). Il n'y a aucun intérêt dans le cas de solutions pures à employer un excès d'eau de chaux qui provoquerait des pertes par dissolution d'oxalate calcique. Dans le cas des solutions complexes, nous verrons qu'il n'en est plus ainsi, l'eau de chaux jouant en plus un rôle neutralisant.

Le temps de précipitation préconisé par les auteurs est assez variable ; LEULIER VELLUZ et GRIFFON [49], indiquent 6 heures à 0°, 12 heures à la température ordinaire. Nous avons constaté que la précipitation était déjà complète après 3 heures de séjour à la glacière (dosages sur 0,90 mgr. et 0,45 mgr., erreurs de — 2%). Nous avons aussi vérifié qu'un séjour de 24 heures à la glacière était sans inconvénients. Nos précipitations ont presque toujours été mises en train le soir vers 18 heures et le dosage terminé le lendemain vers 14 heures. Nous donnons ci-dessous quelques résultats.

Acide oxalique + eau de chaux saturée 2 cc.

LEULIER, VELLUZ et GRIFFON			DORCHE		
Ac. oxalique en mgr. dans la prise		Erreur %	Ac. oxalique en mgr. dans la prise		Erreur %
Mis	Trouvé		Mis	Trouvé	
0,108	0,110	+ 1,8			
			0,112	0,103	—8
				0,103	—8
0,131	0,133	+ 1,5			
0,169	0,172	+ 1,7	0,169	0,163	—4
				0,158	—6
0,225	0,225	0	0,225	0,216	—4
	0,227	+ 0,8		0,220	—2
	0,218	—3,1		0,220	—2
0,337	0,330	—2,1	0,337	0,328	—3
				0,328	—3
0,450	0,454	+ 0,9	0,450	0,441	—2
				0,445	—1
			0,675	0,661	—2
				0,661	—2
			0,900	0,895	—1
				0,891	—1

B) ISOLEMENT DU PRÉCIPITÉ.

GUILLAUMIN [19] signale très justement que recueillir et laver sur un filtre un précipité à peine visible ou parfois pratiquement invisible est « une opération des plus risquées ». Nous avons eu recours à la centrifugation prolongée comme nos prédécesseurs dans cette technique, LEULIER, VELLUZ et GRIFFON [49].

Mais, ainsi que ces auteurs le font remarquer, une minime portion du précipité peut être entraînée lors des décantations, et il est bon d'inclure l'oxalate calcique dans un précipité plus volumineux ; ce précipité devant être inactif sur le permanganate. L'enrobage préconisé par ces auteurs est obtenu en ajoutant une solution de phosphate d'ammoniaque qui donne avec l'eau de chaux en excès un précipité de phosphate tricalcique se déposant avec l'oxalate de chaux. MAUGERI [56] enrobe son oxalate calcique dans un précipité barytique réalisé par addition directe à l'urine d'une solution de chlorure de baryum ; il est permis de supposer que parmi les substances précipitées par le chlorure de baryum toutes ne sont pas inactives sur le permanganate de potasse.

Nous avons entraîné notre précipité par addition d'une goutte de suspension aqueuse à 2/100 de sulfate de baryum gélatineux, car la méthode au phosphate tricalcique s'est révélée inapplicable comme nous le verrons plus loin.

Après centrifugation (vitesse 4.000 tours à la minute) les décantations se font au moyen d'un tube à pointe retournée, relié à une trompe à eau, réalisant une aspiration très modérée .

Au cours de la première centrifugation, les tubes qui renferment un excès d'eau de chaux se recouvrent rapidement d'une légère pellicule de carbonate de chaux dont on n'a pas à se préoccuper. Après une centrifugation de 2 ou 3 minutes, l'oxalate calcique est toujours intégralement rassemblé au fond du tube.

Le lavage du précipité n'offre pas d'intérêt quand on part de solutions pures d'acide oxalique ; il n'en est plus de même si l'on opère sur des résidus de distillation pouvant conserver en dissolution quelques traces d'éther ; à plus forte raison, ce lavage s'impose lorsqu'on s'adressera à des solutions complexes, possédant des substances actives sur le permanganate de potasse autres que l'acide oxalique.

Etant donné la solubilité de l'oxalate de calcium, les nombreux lavages à l'eau distillée ne sont pas recommandables. En effet, deux opérations avec 10 cc. chacune feraient perdre, théoriquement du moins, 0,20 mgr. d'oxalate de calcium, ce qui serait énorme si nous voulons doser des quantités d'acide oxalique comprises entre 0,15 mgr. et 1 mgr.

On réalisera deux lavages avec 1 cc. d'eau glacée chaque fois ; l'erreur sera alors de 0,02 mgr. au plus. L'expérience prouve d'ailleurs que l'erreur est encore moindre, probablement parce que l'oxalate de calcium n'est pas placé dans les conditions d'agitation, de température et de temps de contact qui sont réalisées pour la détermination du coefficient de solubilité.

On pourrait, ainsi que HOLMBERG [25] le préconise, employer l'eau saturée d'oxalate de calcium. Nous avons essayé cette modification ; le pourcentage d'erreur n'est

pas sensiblement diminué. Ce lavage à l'eau saturée d'oxalate de chaux présente des avantages lorsque (et c'est le cas de la méthode de HOLMBERG), les lavages doivent être plus nombreux et plus abondants (rinçage de ballons, de filtres).

C) OXYDATION DE L'OXALATE DE CALCIUM.

Nous ne nous sommes pas arrêtés sur les techniques déterminant l'acide oxalique par d'autres voies que l'oxydation permanganique. Certaines comme la pesée d'un résidu de calcination (CaO ou SO^4Ca) ne conviennent guère à la microanalyse, les autres nous ont paru d'une complication disproportionnée avec le résultat que l'on peut raisonnablement attendre d'elles.

Le dosage de l'acide oxalique par le permanganate de potasse n'a pas besoin d'être rappelé. Les nombreuses techniques de microdosage peuvent se rattacher à deux groupes :

— Oxydation directe de l'acide oxalique par une solution N/100 de permanganate de potasse, à chaud (70 à 80°).

— Oxydation, à froid par un excès de la même solution de permanganate de potasse, en présence de sulfate manganeux ; l'excès de permanganate étant déterminé par le dosage de l'iode qu'il libère aux dépens d'une solution d'iodure de potassium.

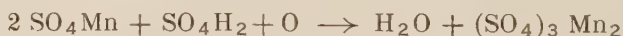
Au premier groupe, on a reproché les possibilités d'al-

tération spontanée à 80° des solutions centinormales de permanganate (LEULIER [48], baisse de titre de 3,6/100 après 3 minutes de chauffage). Cet inconvénient joue certainement assez peu lorsque (et ce serait le cas ici) le permanganate est ajouté froid à la solution oxalique chaude jusqu'à persistance de la coloration rose. De toute façon le dosage de l'ion oxalique par le permanganate à chaud manque de sensibilité (RENAUDIN [70]).

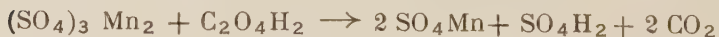
Le deuxième groupe échappe à ce reproche ; il bénéficie en outre de l'extrême sensibilité des virages iodométriques. La petite complication d'avoir à vérifier souvent le titre de la solution mère d'hyposulfite, en est évidemment la rançon.

Nous avons employé la technique d'oxydation à froid préconisée par LEULIER, VELLUZ et GRIFFON [49]. Nous rappelons d'abord son principe (DENIGES [11]) :

Le sulfate manganoux en milieu sulfurique est rapidement oxydé à froid par le permanganate selon l'équation :



Le sulfate manganique formé, encore moins stable que l'acide permanganique retourne immédiatement à l'état de sulfate manganoux et d'acide sulfurique libre en oxydant une quantité équivalente d'acide oxalique :



Ce cycle de réactions se poursuit tant qu'il y a de l'acide oxalique à oxyder. VELLUZ et DESCHASEAUX [85] ont montré que la réaction s'amorce même si l'on

n'ajoute pas de sulfate manganoux ; par contre il devient nécessaire d'ajouter du sulfate manganoux si la solution renferme des sels minéraux (VELLUZ et DESCHASSEAUX [85], RENAUDIN [70]).

Après trois minutes de contact (pour plus de sûreté après cinq minutes), l'oxydation est terminée et l'addition d'iodure de potassium permet de libérer une quantité d'iode proportionnelle au permanganate restant. Le dosage en retour se fait à l'hyposulfite.

Il peut arriver qu'avant l'addition d'iodure, le mélange prenne une coloration brune, mais les sels de manganèse qui la provoquent réagissent tout comme le permanganate sur l'iodure et le titrage iodométrique se fait toujours sur une solution limpide, les cristaux de sulfate de calcium étant peu abondants. Bien entendu lorsque, pour rassembler le précipité d'oxalate de calcium, on emploie une suspension de sulfate de baryte, le dosage iodométrique final porte sur une solution opalescente ; la perception du virage demande un peu d'habitude, mais elle n'est pas moins nette qu'en solution limpide.

Pour obtenir le maximum de sensibilité, on doit utiliser des solutions titrées de permanganate et d'hyposulfite assez diluées ; il serait ridicule cependant d'exagérer ces dilutions. Le titre N/100 pour la solution d'hyposulfite paraît très convenable. Cette solution sera préparée au moment du besoin par dilution d'une solution N/10, elle-même vérifiée assez fréquemment. Le titre de la solution de permanganate sera déterminé pour chaque série de dosages par rapport à l'hyposulfite N/100. Les volumes de ces solutions seront mesurés au moyen de micro-

burettes de 2 ou 3 cc. graduées en centièmes de centimètre cube et dont les micro-gouttes correspondent effectivement à un centième de centimètre cube.

Dans les meilleures conditions, le virage est perçu à une micro-goutte près de solution N/100 d'hyposulfite. Si l'on utilisait des solutions titrées plus diluées, la décoloration demanderait plusieurs gouttes, la sensibilité ne serait pas accrue, elle serait plutôt diminuée en raison de la dilution que crée l'apport d'un plus grand volume de solution.

Dans ces conditions, quelle est la limite de sensibilité de la méthode, quel est le taux minimum d'acide oxalique que l'on peut doser avec une approximation suffisante ? Le virage n'étant jamais perçu pour des additions de solution d'hyposulfite inférieures à 0,01 cc., la limite de sensibilité sera la quantité d'acide oxalique correspondante, soit 0,0045 milligrammes. Dans un dosage d'acide oxalique qui subira du fait des opérations autres que l'oxydation diverses causes d'erreurs, il est difficile de tolérer pour cette seule oxydation une erreur supérieure à 3 pour cent ; on devra donc faire la lecture d'un volume de solution N/100 égal ou supérieur à 0,33 cc. Ces 0,33 cc. correspondent à 0,148 milligrammes d'acide oxalique. « En d'autres termes, le dosage permet l'évaluation à 3/100 près de taux d'acide oxalique supérieurs à 0,15 mgr dans la prise d'essai » (LEULIER [49]).

**D) TECHNIQUE EMPLOYÉE
POUR LE DOSAGE MANGANIMÉTRIQUE.**

Nous donnons maintenant la technique détaillée du dosage manganimétrique.

a) Réactifs :

- 1° Eau de chaux saturée ;
- 2° Suspension de sulfate de baryte à 2/100 ;
- 3° Solution d'acide sulfurique à 20/100 ;
- 4° Solution de sulfate manganoux à 2/100 ;
- 5° Solution d'iodure de potassium à 20/100 ;
- 6° Solution de permanganate de potassium à 0,6/1000
(préparée extemporanément par dilution d'une solution à 6/1000) ;
- 7° Solution d'hyposulfite de sodium centinormale,
(préparée par dilution extemporanée d'une solution décimormale).

b) Mode opératoire :

La solution aqueuse pure d'acide oxalique (3 à 5 cc.) est mesurée dans un tube à centrifuger (de 12 à 15 cc.). On ajoute 2 cc. d'eau de chaux saturée et on abandonne pendant 6 à 24 h. dans la glacière.

Après ces temps de précipitation, on ajoute une goutte de suspension de sulfate de baryum et on agite avec précaution. On centrifuge à grande vitesse pendant 2 à 3 minutes, on décante et on lave deux fois à l'eau glacée (un cc. chaque fois), par centrifugation et décantation successives. Le précipité est additionné dans le tube même de cinq gouttes de solution sulfurique, deux gouttes de solution de sulfate manganoux et 2 cc. exactement

mesurés de solution de permanganate. On agite légèrement et après 5 minutes, on ajoute trois gouttes de solution d'iodure de potassium.

Le titrage se fait par l'hyposulfite sur fond blanc en comparant avec un tube d'eau distillée additionnée d'une goutte de suspension de $\text{SO}^4 \text{ Ba}$. Des opérations identiques sont effectuées sur un égal volume de solution permanganique pure. En multipliant la différence des centimètres cubes d'hyposulfite nécessaires par 0,45 on obtient la teneur en milligrammes d'acide oxalique dans la prise.

CHAPITRE II

Extraction de l'acide oxalique à partir de solutions diverses

A) EXTRACTION A PARTIR DE SOLUTIONS PURES.

L'idéal pour le dosage, serait d'obtenir l'acide oxalique sous forme de solution pure. On tendra donc vers un isolement aussi spécifique et quantitatif que possible.

Certains auteurs (NEUBAUER, AUTENRIETH et BARTH [7] MEYER ZU HORSTE [61]) ont espéré isoler tout l'acide oxalique d'un milieu complexe comme l'urine par simple addition d'un sel soluble de calcium. Dans ces conditions, la précipitation de l'acide oxalique est incomplète, tant en raison de la complexité du milieu (sels divers, pigments) que de la très grande dilution. De plus le précipité est fatalement souillé. A ce sujet les auteurs paraissent d'accord et nos essais personnels nous l'ont démon-

tré. C'est pourquoi nous avons préféré à la précipitation directe, l'extraction éthérée bien que celle-ci ne réalise pas toute la perfection et toute la commodité désirée.

C'est SALKOWSKI [73] qui le premier proposa d'épuiser l'urine par l'éther afin d'en extraire l'acide oxalique. Personne avant lui n'avait eu l'idée d'utiliser ce procédé car l'acide oxalique est réputé très peu soluble dans l'éther. L'acide oxalique, en effet, est moins soluble dans l'éther que dans l'eau ; une partie d'acide oxalique se dissout à 15° dans 8,71 parties d'eau et dans 78,9 parties d'éther ; d'après GOTTLIER (cité par SALKOWSKI) la solubilité serait d'une partie d'acide oxalique pour 62 parties d'éther. Dans ces conditions l'épuisement d'une solution aqueuse d'acide oxalique par l'éther sera une opération difficile.

GUILLAUMIN [19] a déterminé le coefficient de partage de l'acide oxalique entre les phases eau + acide sulfurique, et éther d'après la formule de BERTHELOT et JUNG-FLEISCH. Il en déduit que « si on extrait 6 cc. de solution sulfurique au dixième présumée oxalique par 4 fois 12 cc. d'éther, le calcul pour $K = 6,59$ montre que l'on n'a extrait finalement que 63/100 de l'acide oxalique présent ».

Il faudra réaliser de grandes surfaces de contact entre les phases éthérées et aqueuses, donc par agitation ou tout autre moyen, pulvériser en quelque sorte l'éther au sein de la solution aqueuse ; il faudra aussi et à plusieurs reprises décanter l'éther utilisé et le remplacer par de l'éther neuf.

I. — LES PROCÉDÉS D'EXTRACTION

SALKOWSKI [73] dans son mémoire original prétend extraire complètement l'acide oxalique de l'urine (concentrée au $\frac{1}{3}$) par trois agitations de durée non précisée avec un volume sensiblement égal d'éther. Tous les auteurs qui ont travaillé cette question de l'acide oxalique urinaire s'accordent pour déclarer que trois agitations sont insuffisantes, qu'il s'agisse d'urine ou de solutions pures.

AUTENRIETH et BARTH [7] extraient 0,0315 gramme d'acide oxalique cristallisé dissous dans 20 cc. d'eau par 100 cc. puis 50 cc. d'éther. Quatre agitations ne leur donnent que $\frac{82}{100}$ de l'acide oxalique mis en œuvre ; Cinq leur en donnent $\frac{89}{100}$. Mais s'adressant à des solutions plus diluées (0,001 gr / 100), de concentrations analogues à celles que l'on rencontre dans l'urine, ils ne trouvent plus que « des traces infimes d'acide oxalique, bien inférieures à la quantité mise en œuvre ».

LUZZATTO [54] travaillant sur l'urine de chien, réalise (comme nous l'avons dit) non pas 3 ou 4 épuisements mais 15 ; il est même allé jusqu'à 18.

HOLMBERG [25] pour éviter les agitations longues et onéreuses voire dangereuses (en raison des volumes importants d'éther qu'il faut manipuler) propose une extraction continue au moyen de l'appareil à balancement de WIDMARK [87-88-89]. L'extraction est presque complète, ainsi que le prouvent les chiffres apportés par HOLMBERG, mais la durée de l'opération est fort longue (75 heures).

Enfin il faut noter que SALKOWSKI préconise l'emploi

d'éther additionné de $1/10^{\text{me}}$ de son volume d'alcool ; cet alcool a pour rôle principal de supprimer les émulsions qui pourraient se produire au cours des agitations, il est considéré comme inutile par la plupart des auteurs.

Au début de ce travail, nous avons tenté d'épuiser des solutions aqueuses d'acide oxalique au moyen d'éther ou d'éther additionné d'alcool.

Nous avons agité à trois reprises pendant 10 minutes chaque fois, 4,5 milligrammes d'acide oxalique en solution dans 40 cc. d'eau acidifiée par l'acide chlorhydrique, avec 40 cc. d'éther. Nous avons recueilli seulement 30/100 de l'acide mis en œuvre.

Dans une autre expérience ce traitement exécuté cinq fois consécutives, ne nous a encore donné que 50/100 de l'acide traité.

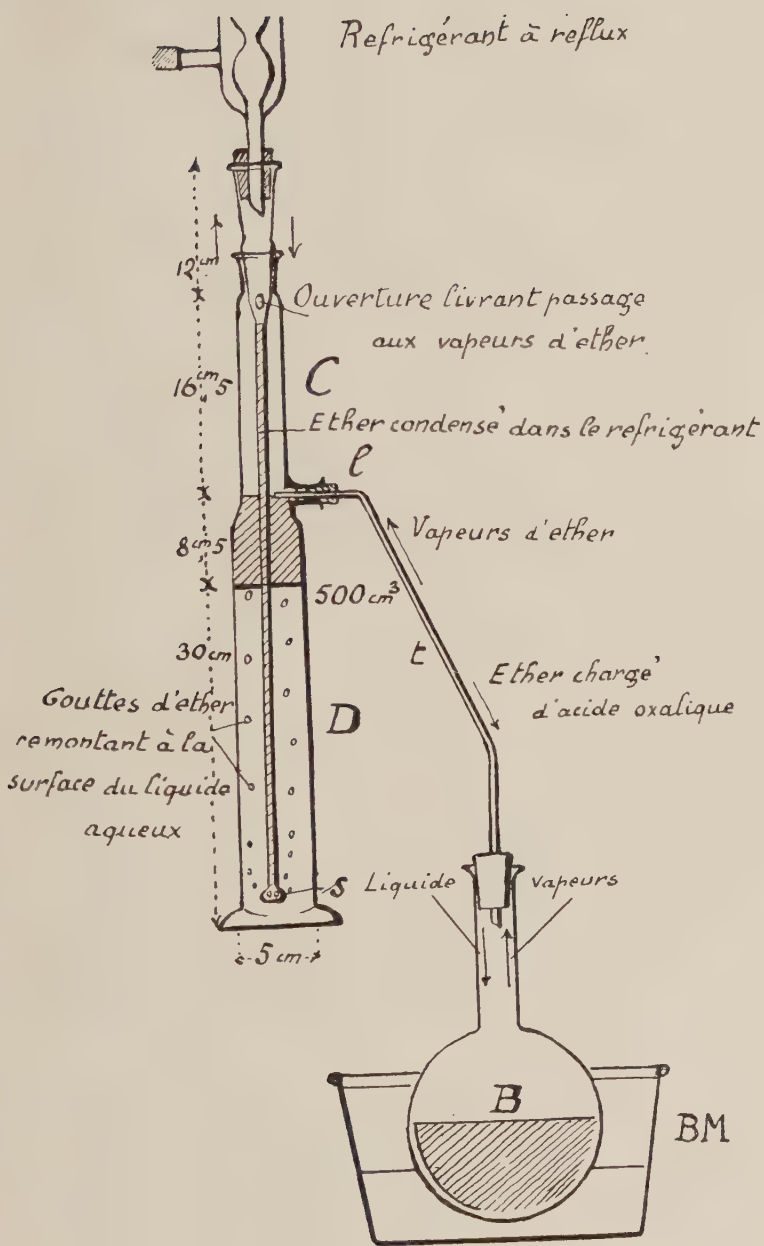
Ces échecs confirmant les travaux antérieurs, nous avons été amenés à essayer l'extraction continue.

II. — LE PROCÉDÉ ADOPTÉ — L'EXTRACTION CONTINUE DE L'ACIDE OXALIQUE EN SOLUTIONS PURES

a) *l'appareil.*

L'appareil utilisé par nous est à quelques variantes près celui préconisé par ANDRÉ [3-4-5] dans ses travaux intitulés, « La diffusion fractionnée ».

Il comprend, une partie essentielle D nommée « diffuseur » par ANDRÉ, un réfrigérant et un ballon générateur de vapeur d'éther.



« Le diffuseur D représente une éprouvette de forme haute, munie à sa partie supérieure d'un goulot allongé et large C portant vers le quart de sa hauteur une tubulure latérale I. A l'intérieur de ce cylindre D, on dispose un long tube vertical dirigé suivant son axe et terminé, en bas par une sphère creuse S percée de petits orifices alignés dans son plan équatorial, en haut par une portion de tube de diamètre plus large percée d'une ouverture O. Ce tube est monté dans le bouchon qui ferme le goulot du diffuseur (1); on s'arrangera dans le montage pour que l'ouverture O se trouve placée un peu au dessous du bouchon. On fixe un réfrigérant dans l'extrémité supérieure de ce tube qui fait saillie hors du bouchon obturant le goulot.

D'autre part, on adapte à la tubulure latérale I un tube d'assez large diamètre t convenablement courbé et dont l'autre extrémité est engagée au moyen d'un bouchon dans le col d'un ballon B placé dans un bain-marie » .

Le cylindre diffuseur D est une éprouvette de 500 cc. qui peut être graduée, le ballon B est un ballon en Pyrex à fond rond d'une contenance de 1.000 cc. Le bain-marie préconisé par ANDRÉ était chauffé par une résistance électrique. Nous nous sommes adressés au bain-marie à niveau constant, voire même à des récipients convenablement couverts (l'évaporation, même au bout de plusieurs jours est minime, si le ballon recouvre exactement l'orifice du couvercle). La source de chaleur est le gaz, bunsen à pleine flamme pour porter le bain-

(1) On peut remplacer ce bouchon par un ajutage rodé.

marie à 40-50°, veilleuse ensuite pour maintenir cette température. Toutes les veilleuses ne fournissent pas la même quantité de chaleur; par tâtonnements, on modifie la hauteur de la flamme jusqu'à obtenir le résultat désiré.

b) fonctionnement de l'appareil :

On introduit dans l'éprouvette D la liqueur oxalique acide à extraire (nous avons traité des volumes variant de 350 à 500 cc.). On verse dans le ballon B une quantité suffisante d'éther (250 à 300 cc.) et on le relie au moyen du tube t à la tubulure latérale. On chauffe le bain-marie jusqu'à ce que l'éther commence à bouillir. Ceci fait, on maintient l'ébullition par le simple jeu de la veilleuse.

« Les vapeurs cheminent dans le tube t, arrivent dans la partie supérieure du diffuseur, passent par l'ouverture O seule issue qui leur soit ménagée et vont se condenser dans le réfrigérant ascendant. Le solvant condensé s'écoule par le tube central et va sortir au fond du diffuseur par les petits orifices aménagés dans la sphère creuse qui termine cette sorte d'entonnoir à longue douille. L'éther moins dense que le liquide aqueux, remonte à la surface en traversant sous forme de gouttes la colonne liquide contenue dans le diffuseur. Le solvant chargé de matériaux qu'il a dissous au passage retourne finalement dans le ballon B par la tubulure t, dont le diamètre doit être assez large pour que vapeur et liquide puissent y circuler en sens inverse sans se gêner. »

On règle la température du bain-marie pour que l'éther retombe par cette tubulure en mince filet ; dans ces conditions, on peut apprécier à un litre par heure le

volume d'éther traversant la couche aqueuse du « diffuseur ». Ce réglage est facile ; les petites variations de pression que subissent les réseaux de distribution de gaz n'influent pas sensiblement sur la marche de l'épuisement, si bien que nous avons toujours laissé fonctionner nos appareils pendant la nuit ; jusqu'à ce jour nous n'avons eu ni accident, ni incident.

Nous donnons les cotes de l'appareil que nous avons fait construire ; il est certain que des appareils de ce type peuvent servir à toute sorte d'épuisement, mais la hauteur du tube vertical, plus exactement la distance séparant l'orifice O de la tubulure I ne conviendrait peut-être pas s'il s'agissait d'utiliser d'autres solvants que l'éther et l'eau.

c) distillation de la solution éthérée :

L'acide oxalique étant obtenu en solution éthérée, il importe de le faire passer en solution aqueuse en même temps que l'on récupérera l'éther. Pour cela, cette solution éthérée sera soumise à la distillation, mais, ainsi que la plupart des auteurs le recommandent, il ne faut jamais l'évaporer à siccité sous peine d'erreurs importantes.

Certains traités de Chimie ou de Pharmacie (GRIGNARD [17], LEBEAU et COURTOIS 1929 [45]) donnent comme température de volatilisation de l'acide oxalique 150 à 160°. Dans leur édition de 1938 LEBEAU et COURTOIS [46] ajoutent « dans l'évaporation des solutions aqueuses une perte notable résulte de l'entraînement de l'acide oxalique par la vapeur d'eau ».

Au cours de nos recherches, des déficits inexplicables

d'acide oxalique nous ont arrêté un certain temps, jusqu'à ce que notre attention eût été attirée sur la volatilisation de l'acide oxalique sec à la température du bain-marie.

Les expériences suivantes démontrent cette volatilisation :

1° 2 cc. d'acide oxalique N/10 (9 mgr.) sont évaporés dans une capsule en Pyrex au bain-marie bouillant, la capsule étant retirée dès l'obtention du résidu sec.

On dose l'acide oxalique dans ce résidu ; il a été trouvé 7,5 mgr. et 8,1 mgr. soit des erreurs de 15 et 9 pour cent.

2° La même évaporation est réalisée mais le résidu sec est maintenu au bain-marie pendant un certain temps.

Dans 1 capsule maintenue 5 minutes on retrouve 5,49 mgr.

—	15	—	—	4,14 mgr.
—	30	—	—	3,16 mgr.
—	60	—	—	0,90 mgr.

soit des erreurs de 39 à 90 pour cent. En prolongeant le séjour des capsules au bain-marie, on arrive au bout d'une heure trente à deux heures à la volatilisation totale du résidu.

3° La même évaporation est réalisée, mais on neutralise au préalable l'acide oxalique par un volume égal de soude N/10. Dans le résidu l'acide oxalique atteint une fois 9 mgr., une autre fois 8,91 mgr., il est encore de 8,91 dans un résidu sec maintenu pendant 2 heures au bain-marie bouillant. Les erreurs sont donc inférieures à 1 pour cent.

4° On réalise la même opération à l'étuve en réglant la

température à 65-70° dans le premier cas, 50-52° dans le second, 37° dans le troisième.

— Le résidu sec étant maintenu 1 heures à 65-70°, on trouve 8,05 et 7,96 mgr. soit des erreurs par défaut de 10,5 et 11,5 pour cent.

— Un certain nombre de capsules renfermant des résidus secs analogues sont maintenues à 50-52° pendant des temps variables.

Au bout 1 h. on trouve 8,95 mgr. soit une erreur de 0,5 %

— 18	— 7,24	—	— 19,5 %
— 22	— 6,93	—	— 23 %
— 48	— 4,86	—	— 46 %

— A la température de 37° les résidus secs sont très peu altérés ; au bout de 18 heures on trouve 8,95 et 8,91 mgr. d'acide oxalique pour 9 mgr. ; au bout de 48 heures on en retrouve encore 8,73 et 8,86.

Force est donc de conclure que l'acide oxalique est susceptible de se volatiliser dès une température fort peu élevée.

Quelques auteurs d'ailleurs signalent cette propriété Ainsi en 1885 SIEGFRIED [77] fait remarquer que « l'acide oxalique commence à se sublimer à une température légèrement inférieure à 100°, ce qui est contraire aux indications d'ailleurs très diverses des manuels ». WURTZ [90] note « Dès 110° une partie de l'acide oxalique se sublime à l'état anhydre, une autre se décompose sans laisser de charbon en donnant $6 \text{ CO}_2 + 5 \text{ CO}$ en même temps qu'il se fait de l'acide formique ».

MEYER ZU HORSTE [61] utilisant le travail de KLEIN et WERNER [35] établit sur ce principe de la volatilisation

à faible température une méthode de dosage de l'acide oxalique.

Enfin GROSSFELD [18] et ses collaborateurs dont nous n'avons connu le travail qu'après nos premiers résultats, démontrent par des expériences analogues aux nôtres que de très fortes pertes se produisent quand on évapore des solutions d'acide oxalique. Ils prétendent que des pertes se produisent aussi quand on évapore des solutions oxaliques saturées par l'ammoniaque.

Nous avons réalisé l'expérience, soit sur des solutions oxaliques saturées par l'ammoniaque, soit sur une solution d'oxalate d'ammoniaque, nous avons constaté une légère acidification du résidu avec perte d'ammoniaque, mais l'acide oxalique a été retrouvé à peu près exactement (8,86 et 8,91 mgr. pour 9 mgr.; 1,418 mgr. pour 1,42.)

A notre connaissance personne avant nous n'a signalé et démontré que l'acide oxalique était susceptible de se volatiliser à des températures notablement inférieures à 100°.

Il nous a paru intéressant de déterminer si cette disparition d'acide oxalique était due à la seule volatilisation du résidu sec ou si cet acide était également entraînable par la vapeur d'eau.

La volatilisation d'acide sec (mais non anhydre) est démontrée en introduisant de l'acide oxalique finement pulvérisé par la tubulure latérale d'une petite cornue que l'on plonge profondément dans un bain-marie bouillant. Au bout d'une dizaine de minutes on aperçoit dans

le col de la cornue de fins cristaux blancs qui sont des cristaux d'acide oxalique.

L'entraînement par la vapeur d'eau a été essayé au moyen de l'appareil de PARNAS et WAGNER. 20 cc. de solution N/10 d'acide oxalique (90 mgr.) sont soumis pendant 30 minutes à un rapide courant de vapeur. Le distillat additionné d'acide sulfurique porté à la température de 80° est coloré en rose par addition d'une seule goutte de solution N/10 de permanganate ; pratiquement donc il ne contient pas d'acide oxalique. Par ailleurs dans le liquide restant dans l'appareil on a retrouvé la totalité de l'acide oxalique introduit.

Cette sublimation de l'acide oxalique à 100° et même à une température un peu supérieure à 50° interdit lors du dosage de cet acide, toute évaporation à sec, au moins toute évaporation de solutions à réaction acide.

Certains auteurs conseillent de ne pas évaporer à sec les solutions éthérées obtenues en vue du dosage de l'acide oxalique car ils redoutent au lieu de la volatilisation une formation d'oxalate d'éthyle (AUTENRIETH et BARTH [7]).

Nous avons mis en solution des poids connus d'acide oxalique dans l'éther et dans l'éther additionné de 10/100 d'alcool. Nous avons soumis un volume connu de ces solutions (250 cc.) à la distillation et à l'évaporation à sec (à une température inférieure à 50°); les résultats n'ont jamais différé de plus de 2/100 du chiffre théorique.

La formation d'oxalate d'éthyle est donc sinon problématique du moins très faible.

À la lumière de ces résultats, nous avons adopté la technique suivante pour la distillation des solutions étherées provenant d'épuisements continus.

La solution à distiller est placée dans un ballon en Pyrex (généralement nous utilisons sans transvasement le ballon employé dans l'extraction). On ajoute 5 à 10 cc. d'eau. On relie le ballon à un réfrigérant descendant et on réalise la distillation au moyen d'un bain-marie porté à la température de 40 à 50°.

Des solutions étherées renfermant des poids connus d'acide oxalique ont été distillées dans ces conditions ; le dosage de l'acide oxalique dans le résidu nous a donné 8,91 et 8,82 mgr. pour 9 mgr.

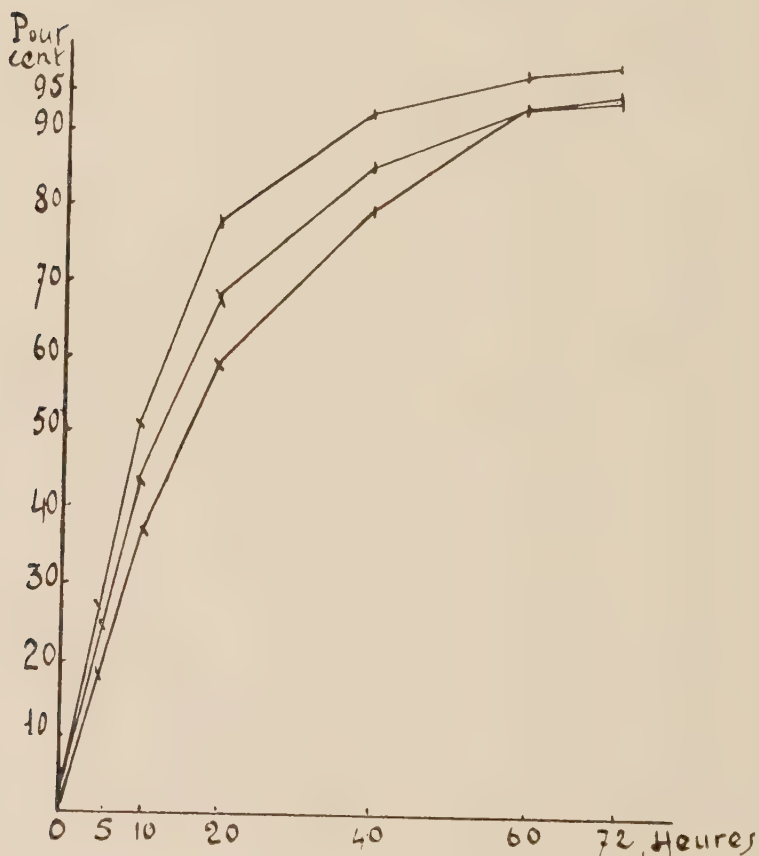
d) résultats obtenus

Nous avons réalisé suivant cette technique l'épuisement de solutions pures renfermant des quantités connues d'acide oxalique.

En premier lieu afin de déterminer le temps nécessaire pour obtenir une extraction satisfaisante nous avons réalisé ce que nous appelons « la courbe d'extraction en fonction du temps ».

On introduit dans le diffuseur un volume connu (450 cc.) de solution aqueuse d'acide oxalique à 20 mgr. d'acide anhydre par litre. Cette concentration est de l'ordre de grandeur de celles signalées pour l'urine humaine. On ajoute 25 cc. d'acide chlorhydrique officinal et on conduit l'épuisement pendant cinq heures. Ceci fait, l'éther est distillé suivant la technique exposée plus haut, le résidu est complété à 10 cc. et le dosage s'opère suivant la technique de LEULIER, VELLUZ et GRIFFON en prenant

2 cc. de ce résidu. De l'éther neuf est placé dans le ballon générateur de l'appareil et l'épuisement reprend pour une nouvelle durée de cinq heures. Comme précédemment, on distille l'éther et on dose l'acide oxalique dans le résidu. On réalise ainsi une série d'épuisements de durée égale à 10 heures, 20 heures, 20 heures et 12 heures. L'acide oxalique est toujours dosé dans le résidu aqueux,



mais son taux devenant très faible dans les liqueurs résultant des 5^e et 6^e épuisements le dosage au lieu de porter sur 2 cc. de liqueur préalablement amenée à 10 cc., porte sur la totalité du résidu.

Les résultats sont les suivants : l'acide oxalique étant exprimé en pourcentage de l'acide mis en œuvre :

Après	5 h.	10 h.	20 h.	40 h.	60 h.	72 h.
1 ^{re} expérience	27,5	50,5	77,25	92	97	98,25
2 ^e	—	23,5	43,5	67,25	84,25	92,25
3 ^e	—	18,25	36,5	59	79	92,5

Nous donnons les courbes obtenues au moyen de ces résultats, courbes où sont portées en ordonnées les pourcentages d'acide extraits et en abscisses les temps exprimés en heure.

A la lecture de ces résultats, une conclusion s'impose, l'extraction n'est pas absolue et se ralentit notablement à partir de la 20^e heure ; mais les chiffres sont acceptables si l'on prolonge l'extraction pendant 72 heures.

Ceci est prouvé au surplus par d'autres expériences où nous n'avons pas suivi l'extraction horaire, mais apprécié l'extraction globale pendant ce même temps de 72 heures.

Voici les résultats obtenus : (calculés en mgr.)

Ac. oxalique pour 1.000	Ac. oxalique dans prise d'essai	Acide oxalique trouvé	Erreur pour 100
1	0,45	0,43	— 5
2,5	1,125	1,07	— 5
10	4,5	4,43	— 1,5
		4,43	— 1,5
15	6,75	6,39	— 5,3
		6,43	— 4,6
20	9	8,59	— 4,5
		8,64	— 4
		8,64	— 4
25	11,25	10,75	— 4,4
30	13,50	12,80	— 5
		12,96	— 4
50	22,50	21,26	— 5,5

B) APPLICATION DE L'EXTRACTION CONTINUE AUX SOLUTIONS COMPLEXES ARTIFICIELLES.

La méthode de dosage étant précisée pour les solutions pures, il convenait de l'expérimenter sur des solutions de composition variable et dont la complexité rappellerait autant que possible la composition chimique des liquides biologiques.

Nous n'avions pas à étudier tous les composés susceptibles d'exister dans ces liquides, mais seulement ceux susceptibles de se dissoudre dans l'éther, lors de l'extraction. En fait, nous nous sommes bornés à examiner l'influence sur la précipitation de l'oxalate de calcium des divers acides organiques que l'on rencontre dans les liquides biologiques et en particulier dans l'urine. Comme certains pigments urinaires sont susceptibles de passer dans l'éther et de souiller les précipités d'oxalate de calcium, nous nous sommes efforcés d'éviter cette cause d'erreur, mais nous n'avons pas réalisé des solutions artificielles de ces pigments, permettant l'étude rigoureuse de leur précipitation.

D'après LAFARGUE [40] les acides organiques éthersolubles que l'on rencontre habituellement dans l'urine de l'homme sont, en plus de l'acide oxalique, les acides citrique, hippurique, glycuronique, lactique, formique, acétique, propionique, butyrique, valérique.

D'une manière générale, l'influence des acides sur l'oxalate de calcium peut se résumer en ceci : — les conditions optima de précipitation de cet oxalate de calcium seront remplies lorsque le pH du liquide au sein duquel

s'effectue la précipitation, sera compris entre 4 et 6 (GUILLAUMIN [19]), 3, 3 et 6 (GROSSFELD [18], 5 et 7 HAMMARSTEN [23]).

— L'ion $[Cl-]$ (Na Cl par exemple) ne gêne pas la précipitation jusqu'à une concentration correspondante à 5 normalités (THOMSEN [81]). D'ailleurs ce n'est qu'exceptionnellement et à très faibles doses que nous avons de l'acide chlorhydrique dans notre éther d'épuisement. Le chlorhydrate d'ammoniaque est cité par les uns comme utile, par les autres comme indifférent à la précipitation de l'oxalate de calcium. Nous avons constaté que jusqu'à la dose de 0,20 gramme dans 7 cc. de liquide (2 cc. de solution à doser plus 5 cc. d'eau de chaux) ce sel était sans influence. Pour des doses supérieures, on note un déficit en oxalate précipité.

— L'individualité des acides ne gêne pas d'après GUILLAUMIN [22], pourvu que les conditions de pH soient respectées ; exception doit être faite pour les acides métaphosphorique et citrique (GUILLAUMIN [22]) pour les acide malique, tartrique et citrique (GROSSFELD [18]).

I. — INFLUENCE DE L'ACIDE CITRIQUE

Après beaucoup de discussions, il est admis que l'acide citrique est un constituant normale de l'urine. Les taux varient entre 0,20 gramme et 1 gramme (OSTERG, d'après LAFARGUE [40]).

L'acide citrique est soluble dans l'eau et dans l'éther, on doit donc le retrouver dans les résidus d'épuisement par l'éther.

On sait que cet acide peut influencer sur la précipitation de l'oxalate de calcium ; GUILLAUMIN [21] dit en

effet, à propos du dosage du calcium : « J'ai toujours constaté après emploi du citrate d'ammonium, un retard dans l'apparition du précipité calcique, et même un déficit en calcium ». FRESSENIUS [16] formule une conclusion analogue. GROSSFELD [18] et ses collaborateurs ont également reconnu le rôle perturbateur de l'acide citrique, mais l'erreur constatée par eux est cette fois une erreur par excès. Cette contradiction et les résultats inconstants de nos premiers dosages nous ont incités à reprendre la question du comportement de l'acide citrique en présence de sels de calcium.

Rappelons d'abord les données classiques (FRESSENIUS édition 1922 [16]) :

« Réaction 3. — Le chlorure de calcium ne produit pas de précipité dans les dissolutions d'acide citrique, ni à froid, ni à chaud. Mais si l'on neutralise avec de la potasse ou de la soude une dissolution quelque peu concentrée d'acide citrique additionnée d'une quantité équivalente ou légèrement supérieure de chlorure de calcium, il se forme aussitôt un précipité de citrate de calcium ($\text{Ca}^2 \text{Cit}^3$, $4 \text{H}_2\text{O}$) qui en présence d'un excès d'ion citrique est facilement soluble, en présence d'ions calcium un peu plus difficilement (1). Il est insoluble dans les

(1) L'ion citrique en excès dissout le citrate de calcium, ainsi que beaucoup d'autres combinaisons insolubles dans l'eau, phosphate et oxalate de calcium, par conséquent les réactions 3 et 4 basées sur la précipitation du citrate de calcium ne pourront se produire que lorsque la quantité d'ion calcium sera suffisante pour précipiter la totalité d'ion citrique présent dans la solution.

hydroxydes de potassium et de sodium, facilement soluble dans le chlorure d'ammonium. Si l'on fait bouillir la dissolution préparée, avec une quantité pas trop grande de chlorure d'ammoniaque, il se dépose du citrate de calcium de même composition, blanc cristallin, mais qui ne se dissout plus dans une solution de chlorure d'ammonium.

Si l'on sature d'ammoniaque une solution d'acide citrique préparée comme il vient d'être dit, ou si, à la solution d'un citrate alcalin, on ajoute du chlorure d'ammonium, du chlorure de calcium et de l'ammoniaque, il ne se produit à froid un précipité qu'au bout de plusieurs heures, ou si l'on ajoute de l'alcool. En faisant bouillir le liquide clair, il se dépose tout d'un coup du citrate de calcium avec les proportions qui viennent d'être indiquées.

Réaction 4. — L'eau de chaux ne précipite pas l'acide citrique ou les citrates à froid. Si l'on chauffe à l'ébullition la dissolution additionnée d'un assez grand excès d'eau de chaux (préparée à chaud) il se forme un précipité blanc de citrate de calcium qui disparaît en grande partie par refroidissement et si l'on agite de temps en temps le récipient ».

Voici ce que nous avons constaté en précisant la zone de pH :

1° l'acide citrique précipite à froid avec le chlorure de calcium, dans la zone des pH supérieurs à 6. Il précipite de même à froid avec l'acétate de calcium.

2° l'acide citrique précipite à chaud avec le chlorure

de calcium dans la même zone des pH, il précipite dans les mêmes conditions avec l'acétate de calcium.

3° le citrate de calcium obtenu est soluble dans un excès d'aide citrique ou de citrate.

A partir des solutions complexes renfermant à la fois les ions citriques et oxaliques on peut donc obtenir des précipités d'oxalate de calcium souillés de citrate de calcium si la proportion de sel calcique ajoutée est convenable, d'où erreur par excès, que le dosage soit terminé pondérablement ou oxydimétriquement. Ceci expliquerait les résultats de GROSSFELD [18] et certaines de nos constatations. Mais il faut rechercher une autre explication pour les erreurs par défaut signalées par FRESSENIUS [16] et par GUILLAUMIN [21].

Reprenons ces divers points :

a) Le citrate de calcium précipite à chaud.

L'acide citrique et les citrates alcalins précipitent à chaud par un excès d'eau de chaux. Si l'on ajoute à une solution titrée d'acide citrique une solution également titrée de chaux, on voit le précipité apparaître lorsqu'un des carboxyles de l'acide citrique est saturé par la chaux.

Avec le chlorure de calcium l'acide citrique ne donne pas de précipité, mais les citrates alcalins en donnent. La quantité de calcium nécessaire pour que la précipitation commence à se produire, correspond sensiblement à la formation d'un citrate monocalcique.

Il en est exactement de même pour l'acétate de calcium.

b) Le citrate de calcium précipite à froid.

Ni l'acide citrique, ni les citrates ne précipitent à froid par l'eau de chaux ; ceci malgré l'addition d'acétate de soude ou quelles que soient les valeurs du pH.

L'acide citrique additionné d'un excès de chlorure de calcium ne donne pas de précipité, mais si l'on élève le pH du milieu au-dessus de 6 un précipité de citrate de calcium se produira. Cette précipitation ne commence guère avant 24 heures ; elle se poursuit et devient très abondante au bout de 2 ou 3 jours, du moins en solutions assez concentrées.

L'acétate de calcium donne à froid un abondant précipité avec l'acide citrique. Le citrate formé cristallise lentement, il n'apparaît guère avant 2 ou 3 heures et ce n'est qu'au bout de 2 jours que la précipitation n'augmente plus. Les citrates alcalins précipitent dans les mêmes conditions.

c) Surcharge des précipités d'oxalate de calcium par du citrate de calcium .

On a traité des solutions renfermant des quantités connues d'acide oxalique et d'acide citrique par du chlorure de calcium dans un cas, par de l'acétate de calcium dans l'autre. Les précipités recueillis ont été soumis au

dosage manganimétrique. Les résultats trouvés sont consignés ci-dessous :

Ac. oxalique mgr.	Ac. citrique mgr.	Ac. oxalique trouvé mgr.	Erreur %
I. — Précipitation par CaCl^2 (2 cc. de solution à 5/100) volume final 6 cc. temps de contact 18 heures.			
0,45	42	0,43	— 5
0,45	42	0,41	— 9
0,90	42	0,85	— 5
2. — Précipitation par CaCl^2, temps de contact 48 heures.			
0,90	42	1,80	+ 100
0,90	42	1,62	+ 80
3. — Précipitation par $(\text{CH}^3\text{COO})^2 \text{Ca}$ (2 cc. de solution à 5/100) volume final 6 cc. temps de contact 18 heures.			
0,45	42	1,80	+ 300
0,45	42	2,55	+ 466
0,90	42	1,07	+ 18
0,90	42	2	+ 122
1,35	42	1,86	+ 38
1,35	42	2,16	+ 60

On peut dire que dans certaines circonstances l'oxalate de calcium entraîne du citrate, impureté qui n'est pas sans influence sur le permanganate.

d) Le citrate de calcium précipite à froid sous l'influence du phosphate tricalcique.

Nous avons observé cette influence du phosphate de calcium parce que nous utilisions pour rassembler nos précipités d'oxalate de calcium l'addition de phosphate

d'ammonium à une liqueur contenant de l'eau de chaux en excès.

Si à 5 cc. d'eau de chaux additionnés d'acide citrique on ajoute 0,5 cc. de solution de phosphate d'ammonium, il se forme un précipité qui, après deux lavages à l'eau, décolore à froid le permanganate de potasse en présence de sulfate manganoux. Evidemment, seul l'acide citrique peut être considéré comme responsable de cette réaction.

L'acide citrique est oxydé par le permanganate, mais l'oxydation n'est ni aussi régulière, ni aussi rapide que celle de l'acide oxalique. Ainsi par contact à froid en présence de SO^4Mn :

0,70 mgr. d'ac. citrique en 5 min. consomme	2,20 cc. de $\text{MnO}^4\text{K N}/100$
0,70 — 30 — —	2,60 —
0,70 — 60 — —	2,93 —
0,70 — 120 — —	3,22 —
0,70 — en s'oxydant complètement consommerait	6,3 cc.

Nous avons ajouté à 5 cc. d'eau de chaux des quantités variables d'acide citrique, de citrate de soude ou d'ammoniaque puis des quantités également variables de phosphate d'ammoniaque ou d'acide phosphorique. Nous avons obtenu des précipités réagissant avec le permanganate, sauf dans le cas des fortes concentrations en ion citrique. On sait, en effet, que l'ion $[\text{cit}-]$ dissout le phosphate de chaux (FRESENIUS [16].)

Voici quelques résultats :

I. — Sol. de phosphate d'ammoniaque à 0,5/100 (vol. employé 0,5 cc.)

ac. citr. 0,70 mgr. $\text{MnO}^4\text{K N}/100$ cons. par ppté	1,20 cc.
— 1,40 — — —	2,37 —
— 14 — — —	5,53 —

II. — Sol. d'acide phosphorique à 0,5/100 (vol. employé 0,5 cc.)

ac. citr. 0,70 mgr. MnO^4K N/100 cons. par ppté 1,12 cc.

— 1,40 —	—	—	—	2 —
— 14 —	—	—	—	4,70 —

Il y a donc une sorte de phénomène d'entraînement du citrate de calcium par l'ion phosphorique, phénomène qui mérite une étude spéciale que nous poursuivrons ultérieurement. Il nous obligeait à abandonner l'emploi du phosphate tricalcique pour rassembler nos précipités d'oxalate de calcium.

Ce travail était terminé lorsque nous avons eu connaissance des travaux de KUYPER [39]. Aboutissant à des conclusions analogues aux nôtres, cet auteur a reconnu que la précipitation de l'acide citrique à l'état de sel de calcium, généralement incomplète, est rendue totale si l'on opère en présence de phosphate.

e) A partir d'un certain taux l'acide citrique empêche la précipitation de l'oxalate de chaux.

En opérant la précipitation et le dosage de l'acide oxalique dans des solutions renfermant de l'acide citrique, nous avons rencontré souvent des erreurs par défaut (ainsi que FRESSENIUS et GUILLAUMIN le signalent). Ces erreurs se produisaient lorsque l'agent précipitant était soit l'eau de chaux, soit l'acétate ou le chlorure de calcium en solutions diluées. De plus, alors que l'ac. oxalique en solution pure donne avec l'un ou l'autre de ces agents un précipité immédiat, en présence d'acide citrique il n'y a, sauf pour les très faibles concentra-

tions en cet acide, aucune précipitation instantanée. Par contre, la précipitation est à peu près totale en trois heures, ou plutôt n'augmente plus après trois heures comme c'est le cas en solutions pures.

La technique de LEULIER, VELLUZ et GRIFFON [49] que nous utilisons fait précipiter l'acide oxalique par 2 cc. d'eau de chaux saturée. Nous reproduisons ci-dessous les résultats obtenus en opérant suivant cette technique le dosage de 0,9 mgr. d'acide oxalique dissous dans 2 cc. d'eau, additionné de quantités croissantes d'acide citrique (quantités exprimées en ac. citr. aq.).

Acide oxalique (mgr.)	Acide citrique (mgr.)	Acide oxalique trouvé (mgr.)	Erreur %
0,9	1,78	0,891	— 1
0,9	8,9	0,904	+ 0,5
0,9	17,8	0,90	0
0,9	26,7	0,864	— 4
0,9	32,13	0,859	— 4,5
0,9	42	0,828	— 8
0,9	42	0,832	— 7,5
0,9	42	0,850	— 5,5
0,9	84	0,769	—14,5

Notre but était de doser exactement l'acide oxalique en présence d'une quantité d'acide citrique inférieure ou égale à 50 mgr. dans une prise d'essai de 2 cc. (ceci correspondrait, toutes opérations d'extraction faites, à une solution d'acide citrique à 1 gr. pour 1.000). D'après ces résultats, on voit que notre but n'était pas atteint.

Deux modifications étaient possibles : soit ajuster à pH 5 les mélanges trop chargés en acide citrique pour être amenés à ce pH ou à un pH supérieur par les 2 cc.

d'eau de chaux, soit ajouter une plus grande quantité d'eau de chaux. Nous reviendrons plus loin sur la première de ces modifications, car c'est la seconde que nous avons été obligés de mettre en pratique.

Ci-dessous les résultats obtenus en opérant suivant la technique LEULIER, VELLUZ et GRIFFON, le dosage de diverses quantités d'acide oxalique dissoutes dans 2 cc. d'eau et additionnées de quantités croissantes d'acide citrique. Le volume d'eau de chaux ajouté ayant été porté, après divers tâtonnements, à 5 cc. au lieu de 2.

Acide oxalique (mgr.)	Acide citrique (mgr.)	Acide oxalique retrouvé (mgr.)	Erreur %
0,9	—	0,886	— 1,5
0,9	1,78	0,877	— 2,5
0,9	3,56	0,886	— 1,5
0,9	7,12	0,904	+ 0,5
0,9	8,90	0,904	+ 0,5
0,9	10,68	0,873	— 3
0,9	12,46	0,900	0
0,9	14,24	0,891	— 1
0,9	16,02	0,900	0
0,9	17,80	0,882	— 2
0,9	17,80	0,886	— 1,5
0,9	26,70	0,873	— 3
0,9	35,60	0,900	0
0,9	42	0,900	0
0,9	42	0,895	— 0,5
0,9	42	0,891	— 1
0,45	42	0,432	— 4
1,35	42	1,336	— 1
1,35	42	1,314	— 2,6

Acide oxalique (mgr.)	Ac. citrique mgr.	Acide oxalique retrouvé (mgr.)	Erreur %
0,9	52,5	0,882	— 2
0,9	52,5	0,895	— 0,5
0,45	52,5	0,432	— 4
1,35	52,5	1,336	— 1
0,9	63	0,882	— 2
0,9	63	0,873	— 3
0,9	73,5	0,837	— 7
0,9	84	0,846	— 6
0,9	84	0,823	— 8,5
0,9	105	0,846	— 6
0,9	126	0,544	—39
0,9	157,5	0,72	—20
0,9	210	0,747	—17

Ces résultats prouvent que l'acide citrique ne paraît guère gêner la précipitation de l'oxalate de calcium par l'eau de chaux (5 cc.) lorsqu'il s'en trouve moins de 63 mgr. dans 2 cc., ou, ce qui revient à peu près au même, lorsque l'acide citrique se trouve dans la solution mixte oxalique-citrique à un taux qui ne dépasse pas sensiblement 3/100 (correspondant, toutes opérations d'extraction faites à 1,20 gr. pour 1.000 environ). L'excellence de la plupart de ces résultats pourrait cependant faire croire à un léger entraînement (pratiquement négligeable). En effet, nos erreurs expérimentales par défaut sont souvent inférieures à celles observées en solution pure jusqu'à une teneur en acide citrique de 50 mgr. alors qu'elles augmentent à partir de 70 mgr.

Comme nous le disions plus haut, on peut être tenté

de ramener à pH 5 les mélanges à pH plus faible. Cette opération n'améliore pas sensiblement les résultats ; souvent même le chiffre obtenu est plutôt moins bon. Si par mégarde le pH dépasse 6, le résultat devient franchement mauvais. Et de fait, les citrates alcalins (pH non ramenés à 5) rendent déficitaire la précipitation de l'oxalate de calcium dès un taux notablement moins élevé que celui de l'acide citrique libre.

Suivent deux tableaux concernant les citrates de sodium et d'ammonium ; les quantités de citrate sont exprimées en acide citrique hydraté pour rendre les résultats plus comparables avec ceux présentés plus haut.

I. — *Citrate de soude*

Ac. oxalique (mgr.)	Citrate de Na (mgr. d'ac. citr.)	Ac. oxalique trouvé mgr.	Erreur %
0,9	0	0,886	— 1,5
0,9	1,78	0,909	+ 1
0,9	8,9	0,868	— 3,5
0,9	16,06	0,882	— 2
0,9	17,80	0,819	— 9
0,9	17,80	0,873	— 3
0,9	21	0,828	— 8
0,9	26,25	0,679	—24,5
0,9	31,5	0,567	—37
0,9	42	0,351	—61
0,9	42	0,508	—43,5

II. — Citrate d'ammoniaque

Ac: oxalique mgr.	Citrate d' NH_4 (mgr. d'ac. citr.)	Acide oxalique retrouvé (mgr.)	Erreur %
0,9	0	0,895	— 0,5
0,9	1,78	0,882	— 2
0,9	8,9	0,886	— 1,5
0,9	16,06	0,877	— 2,5
0,9	17,80	0,828	— 8
0,9	17,80	0,855	— 5
0,9	21	0,742	—17,5
0,9	26,25	0,576	—36
0,9	31,50	0,531	—41
0,9	42	0,346	—61,5
0,9	42	0,526	—41,5
0,9	63	0,135	—85

Ces résultats tout à fait concordants pour les deux citrates examinés montrent que les deux sels nuisent déjà nettement à la précipitation de l'oxalate de calcium lorsqu'ils se trouvent à la dose (exprimée en acide citrique) de 21 mgr. dans 2 cc. ou, ce qui revient au même, lorsqu'ils se trouvent dans la solution mixte oxalique-citrique à un taux voisin de 1/100. On ne peut pas ne pas être frappé de ce rapport de 1 à 3 entre l'influence des citrates et celle de l'acide libre.

En ramenant les mélanges citrate-eau de chaux à pH 5 on retombe sensiblement sur les résultats obtenus avec l'acide citrique.

I. — *Sans correction de pH*

Acide oxal. (mgr.)	Exprimé en acide citrique (mgr.)		Ac. oxalique retrouvé (mgr.)	Erreur %
0,9	Citrate Na	42	0,351	—61
0,9	— NH ⁴	42	0,346	—61,5
0,9	Ac. citrique	42	0,891	— 1

II. — *pH ajusté à 5*

Acide oxal. (mgr.)	Exprimé en acide citrique (mgr.)		Ac. oxalique retrouvé (mgr.)	Erreur %
0,9	Citrate Na	42	0,886	— 1,5
0,9	— NH ⁴	42	0,882	— 2
0,9	Ac. citrique	42	0,891	— 1

En résumé : 1° Le citrate de calcium est susceptible de cristalliser aux dépens de solutions renfermant à la fois les ions $[Ca+]$ et $[Cit-]$. Cette précipitation dépend essentiellement du pH et de la dilution du milieu ; elle n'est à froid jamais instantanée. La présence de l'ion PO^4 amène dans un milieu de pH convenable la précipitation quasi immédiate d'un complexe renfermant les trois ions $[Ca+]$ $[Cit-]$ $[PO^4-]$.

2° La présence à côté des ions $[Ox-]$ et $[Ca+]$ d'une certaine quantité d'ions citriques retarde la précipitation de l'oxalate de calcium et la rend plus ou moins incomplète suivant la proportion d'ion citrique. Dans la zone des pH supérieurs à 6, la précipitation est rendue incomplète par des proportions d'ions citriques moindres que celles observées dans la zone des pH plus acides.

3° Il importe de tenir compte de ces observations pour le dosage de l'acide oxalique dans l'urine ; comme ce

liquide renferme au plus un gramme d'acide citrique par litre, on pourra en traiter 500 cc. par l'éther, amener le résidu de distillation à 20 cc. puis doser l'acide oxalique dans 1 ou 2 cc. de ce liquide.

Dans ces conditions et pour un pH voisin de 5 la précipitation de l'oxalate de calcium ne sera pas troublée par l'acide citrique.

II. — INFLUENCE DE L'ACIDE LACTIQUE

L'acide lactique éliminé, à l'état normal, par les urines ne dépasse guère 60 mgr. par 24 heures. (LAFARQUE [40]). Ce taux peut s'élever notablement dans certaines circonstances, dans l'effort musculaire par exemple.

Pour éviter de multiplier les épuisements qui prenaient beaucoup de temps, nous avons d'abord étudié l'influence de l'acide lactique sur la précipitation de l'oxalate de calcium aux dépens de solutions préparées extemporanément. Ainsi nous avons réalisé les solutions suivantes :

a)	acide lactique	45 mgr.
	— oxalique	9 —
	eau q. s. pour	20 cc.
b)	acide lactique	180 mgr.
	— oxalique	9 —
	eau q. s. pour	20 cc.

Ces solutions représentent à peu près les résidus qui seraient obtenus après épuisement de 450 cc. d'une solution renfermant l'une 100 mgr. d'acide lactique et 20

mgr. d'acide oxalique par litre, l'autre 400 mgr. d'acide lactique et 20 mgr. d'acide oxalique par litre.

Les dosages réalisés sur 2 cc. par le procédé indiqué plus haut ont donné :

solution a

Acide oxalique
retrouvé

dans 2 cc.	0,895	au lieu de 0,9	erreur — 0,5
	0,891	— 0,9	— — 1

solution b

Acide oxalique
retrouvé

dans 2 cc.	0,882	au lieu de 0,9	erreur — 2
	0,882	— 0,9	— — 2

On a ensuite soumis à l'épuisement pendant 72 heures une solution renfermant 100 mgr. d'ac. lactique et 20 mgr. d'acide oxalique par litre. Le dosage de l'acide oxalique dans le résidu a permis d'en retrouver une fois 19 mgr. (erreur - 5/100), une autre fois 18,90 mgr. (erreur - 5,5.100).

On peut donc conclure que l'acide lactique aux doses normales ne gêne pas le dosage de l'acide oxalique dans les liqueurs où ces deux acides coexistent.

III. — INFLUENCE DE L'ACIDE HIPPURIQUE

L'acide hippurique, autre constituant normal de l'urine humaine s'y trouve à un taux de 0,50 à 1,75 grs par 24 heures (d'après LAFARGUE [40]). Cet acide est soluble dans l'éther mais il est peu soluble dans l'eau ;

par contre ses sels sont assez solubles, en particulier son sel de calcium. L'éther l'enlèvera donc à ses solutions aqueuses acides, mais le résidu d'évaporation de l'éther ne se dissoudra pas intégralement dans le petit volume d'eau employé pour dissoudre l'acide oxalique. Une partie de l'acide hippurique se trouvera donc éliminée.

On a soumis à l'épuisement pendant 72 heures une solution renfermant 500 mgr. d'acide hippurique et 20 mgr. d'acide oxalique par litre. Le résidu de distillation de l'éther est encombré de cristaux d'acide hippurique non dissous ; on les sépare par filtration après avoir amené au volume de 20 cc. ce résidu aqueux. Le dosage de l'acide oxalique dans le filtrat a permis d'en retrouver une fois 19 mgr. (erreur - 5/100), une autre fois 19,20 mgr. (erreur - 4/100).

Une assez grande quantité d'acide hippurique étant éliminée par filtration, nous avons introduit directement dans 2 cc. de solution N/100 d'acide oxalique, des poids relativement élevés d'acide hippurique dissous avec la quantité calculée de solution alcaline N. L'acide oxalique a été dosé par la méthode habituelle. Les résultats sont les suivants :

Acide oxalique (mgr.)	Acide hippurique (mgr.)	Acide oxalique trouvé
0,9	18	0,886
0,9	72	0,90

soit des erreurs acceptables (1,5/100 et 0).

Ces quantités d'acide hippurique correspondraient, s'il s'agissait de solutions provenant d'épuisements étherés, à des taux de 0,40 gr. et 1,60 gr. par litre. Il est

donc permis de négliger complètement l'influence de l'acide hippurique sur la précipitation de l'oxalate de calcium.

IV. — INFLUENCE DE L'ACIDE FORMIQUE

Parmi les acides volatils rencontrés dans l'urine, l'acide formique paraît le plus étudié et le plus important quantitativement. DAKIN, JANNEY et WAKEMANN (cités par LAFARGUE [40]) indiquent des teneurs dans l'urine allant de 28,9 à 118,6 milligrammes.

Cet acide est soluble dans l'éther et dans l'eau, il se retrouvera dans le résidu de l'extraction étherée. Son sel de calcium est soluble, il reste à démontrer que sa présence ne gêne pas la précipitation de l'oxalate calcique.

Nous avons réalisé les solutions suivantes :

a)	acide formique	45 mgr.
	— oxalique	9 —
	eau q. s. pour	20 cc.
b)	acide formique	90 mgr.
	— oxalique	9 —
	eau q. s. pour	20 cc.

Ces solutions représentent le résidu qui pourrait être obtenu après épuisement de 450 cc. d'une solution renfermant 100 mgr. d'acide formique dans le premier cas, et 200 mgr. dans le second, pour 20 mgr. d'acide oxalique et 1 litre d'eau. Les dosages réalisés comme indiqué ont donné :

sur 2 cc. de sol.	a	ac. oxal. trouvé	0,882	pour	0,90
2 cc.	—	—	0,882	—	0,90
				erreur —	2/100

sur 2 cc. de sol. b	ac. oxal. trouvé	0,886	pour	0,90
2 cc. —	—	0,877	—	0,90
	erreurs	—1,5	et	—2,5/100

De plus, on a soumis à l'épuisement pendant 72 heures une solution renfermant par litre 100 mgr. d'acide formique et 20 mgr. d'acide oxalique. Dans un premier dosage, on a retrouvé 19,10 mgr. d'acide oxalique (erreur —4,5) dans un second dosage 19 mgr. (erreur —5).

L'acide formique paraît donc sans influence sur le dosage de l'acide oxalique urinaire.

V. — INFLUENCE GLOBALE DE LA TOTALITE DES ACIDES ORGANIQUES URINAIRES

Nous nous sommes bornés à l'étude de l'influence des acides citrique, lactique, hippurique et formique.

Nous avons pensé pouvoir négliger les autres acides organiques urinaires éhéro-solubles.

Après avoir précisé l'influence de ces divers acides, une première synthèse s'imposait : Réunir ces acides en une même solution et la soumettre à son tour à l'épuisement éthéré.

Nous avons donc réalisé deux solutions d'acides organiques auxquelles nous avons ajouté de l'urée et du chlorure de sodium pour obtenir une densité comparable à celle de l'urine. A des volumes déterminés de chacune de ces deux solutions, il était ajouté des quantités connues d'acide oxalique (les doses oscillant entre 10 et 35 mgr. par litre).

Formule de la solution A :

Acide citrique	0,40 gr.
— lactique	0,05 —
— hippurique	0,50 —
Chlorure de sodium	12 —
Urée	20 —
Eau q. s. pour	1.000 cc.

Formule de la solution B

Acide citrique	1 gr.
— lactique	0,05 —
— hippurique	0,50 —
Chlorure de sodium	12 —
Urée	20 —
Eau q. s. pour	1.000 cc.

L'extraction éthérée de 72 heures est effectuée sur des prises d'essai variant de 400 à 450 cc. Après distillation de l'éther en présence de 10 cc. d'eau, on dilue le résidu aqueux à 20 cc. et on prélève 2, parfois 4 cc. de solution claire ; les cristaux d'acide hippurique ayant été éliminés par filtration. Appliquant les règles établies plus haut (voir le paragraphe consacré à l'acide citrique), on précipite par 5 cc. d'eau de chaux au lieu de 2 comme dans la technique primitive. Avant de centrifuger, on rassemble le précipité à l'aide d'une suspension de sulfate de baryte à 2/100 (une goutte) et non par enrobage dans un précipité de phosphate tricalcique qui entraînerait de l'acide citrique. Voici les chiffres obtenus sur ces solutions complexes.

Solution traitée	Ac. oxalique pour 1000 cc. (mgr.)	Ac. oxalique dans prise d'essai (mgr.)	Ac. oxalique trouvé (mgr.)	Erreur pour 100
Sol. A	15	6,75	6,61	—1,5
	20	9	8,77	—2,5
	25	11,25	10,65	—5,4
	35	15,75	14,98	—4,8
			15	—4,7
Sol. B	10	4,5	4,36	—3
	20	9	8,64	—4
			8,55	—5
	25	11,25	10,66	—5,2
	30	13,50	13,14	—2,7
			13,23	—2
	35	15,75	14,94	—5

A la lecture de ces résultats, deux conclusions s'imposent : les erreurs ne dépassent pas 5,4 %, donc le dosage peut être considéré comme acceptable ; ces erreurs sont toujours des erreurs par défaut, par suite il semble que l'on n'ait pas à craindre la surcharge de l'oxalate calcique par d'autres sels organiques.

Nous avons jugé utile cependant de vérifier si le précipité était bien constitué uniquement par de l'oxalate de calcium.

Dans ce but, un poids connu de ce précipité a été calciné et transformé en sulfate de calcium. Un déficit ou un excès de sulfate de calcium prouverait que le précipité n'est pas de l'oxalate calcique pur.

Nous avons d'abord recueilli une quantité de précipité qui permette un dosage pondéral acceptable.

Dans une éprouvette on traite par 2.500 cc. d'eau de chaux la solution suivante :

Acide citrique	50	gr.
— lactique	2,50	—
— hippurique	q. s.	pour saturer
— oxalique	0,50	gr.
Eau q. s. pour	1.000	cc.

Les proportions d'acides, d'eau et d'eau de chaux sont les mêmes que celles résultant de l'épuisement d'une solution complexe (type B).

Après 24 heures de contact, le précipité est rassemblé au fond du récipient ; la majeure partie du liquide peut être décantée ; puis on recueille le précipité sur un filtre sans plis, et on le lave jusqu'à ce que le filtrat ne précipite plus par l'eau de chaux. Après une première dessiccation à 100°, on détache le précipité du papier en négligeant au besoin quelques particules, mais en évitant d'entraîner la moindre fibre de papier ; on le reçoit dans une capsule de platine tarée, le pulvérise grossièrement et le dessèche jusqu'à poids constant ; enfin on pèse ce précipité supposé être de l'oxalate de calcium pur.

Cet oxalate est calciné, repris après refroidissement par une solution 1/5 d'acide chlorhydrique et transformé en sulfate de calcium par addition d'un très léger excès d'acide sulfurique. La masse gélatineuse obtenue est séchée, d'abord à l'étuve à 100°, puis avec précaution dans la flamme du Bunsen, pour terminer on calcine et on pèse.

A 146 gr. d'oxalate de calcium (1) correspondent 136 gr. de sulfate de calcium; il est donc facile de voir si le poids de sulfate obtenu correspond au poids que donnerait théoriquement la prise d'essai d'oxalate de calcium.

Voici nos résultats :

	1 ^{re} expérience	2 ^e expérience
Précipité initial	0,5235	0,8890
Sulfates obtenus	0,4845	0,8095
SO ⁴ Ca calculé d'après le poids du précipité initial	0,4969	0,8276
Erreur absolue	0,0124	0,0181
Erreur relative	—2,5 %	—2,18 %

Nous pouvons donc admettre que les précipités obtenus par action de l'eau de chaux sont constitués par de l'oxalate de calcium suffisamment pur.

Il est maintenant possible de tirer de ce chapitre la conclusion suivante :

Avec les mélanges et les prises d'essai que nous avons utilisés, les acides organiques ne gênent pas sensiblement la précipitation de l'oxalate de calcium, mais, à des doses plus élevées, on peut obtenir des résultats trop faibles attribuables à un déficit d'eau de chaux, dont on ne peut cependant exagérer le volume sans risquer des pertes par dissolution de ce même oxalate.

(1) à 100° c'est C²O⁴Ca, H²O que l'on obtient et que l'on pèse (FRESENIUS [15]).

D'ailleurs les proportions adoptées par nous correspondent aux chiffres donnés par la plupart des auteurs qui se sont occupés de la question des acides organiques de l'urine humaine.

C) EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE DANS LES URINES

On pouvait espérer appliquer intégralement à l'urine la technique mise au point pour les solutions dites complexes. Mais l'urine est un milieu encore plus complexe ; d'autres substances que les acides organiques passent dans l'éther et viennent perturber le dosage de l'acide oxalique.

Si l'on soumet à l'épuisement par l'éther un volume déterminé d'urine acidifiée par l'acide chlorhydrique, on obtient après 72 heures une solution éthérée fortement colorée et un dépôt boueux noirâtre. La distillation de ce mélange après addition d'eau, laisse comme résidu un liquide fortement coloré, tenant en suspension cette boue noirâtre que l'on peut éliminer par filtration. L'application de notre méthode de dosage à cette solution donne des résultats assez décevants. Le précipité recueilli après addition d'eau de chaux est assez fortement coloré ; si l'on traite 1, 2 et 4 cc. de la même solution, les résultats ne sont pas comme 1, 2 et 4, mais parfois comme 1,5, 2,25 et 4 ; enfin si l'on ajoute à un volume connu de cette solution une certaine quantité d'acide oxalique, le chiffre trouvé par le dosage est généralement plus élevé que le chiffre théorique.

I. — ETABLISSEMENT D'UNE TECHNIQUE
DE DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE
DANS LES RESIDUS D'EPUISEMENTS URINAIRES

Le fait le plus frappant est que l'oxalate de calcium entraîne des pigments urinaires. La question des pigments urinaires est trop complexe pour que nous ayons essayé d'identifier ces pigments. Nous avons simplement constaté qu'ils possédaient un certain nombre de propriétés : solubilité dans l'eau, l'éther, le chloroforme et surtout l'acétone ; changements de coloration suivant l'acidité du milieu (jaunes en milieu acide, bruns foncés en milieu alcalin).

De plus les précipités d'oxalate de calcium formés dans les mélanges à réaction alcaline sont plus chargés en pigments que ceux qui s'obtiennent dans les mêmes mélanges acidifiés. Nous avons réalisé un certain nombre d'expériences sur des solutions aqueuses provenant d'épuisements d'urines par l'éther. Ces solutions étaient précipitées par l'eau de chaux et tantôt le pH du mélange était amené à 5 par addition de quelques gouttes d'acide acétique, tantôt il était maintenu à son taux naturel.

Urine	pH du mélange traité		Ac. oxalique rapporté à un litre d'urine
M ₁₁	pH	7	22,44
	pH	5	20,32
			20
M ₁₄	pH	7	7
	pH	5	5,6
			5,4
			5,4
M ₂	pH	7	31,80
	pH	5	25,60
			25

Nous avons ajouté à quelques solutions aqueuses provenant d'épuisements d'urines, des quantités connues d'acide oxalique ; les mélanges ont été traités par l'eau de chaux, le pH n'étant pas ramené à 5 ; les résultats sont les suivants :

Vol. de résidu mis en œuvre	Acide oxalique dans la prise d'essai (mgr.)	Acide oxalique ajouté (mgr.)	Acide oxalique total (mgr.)	Acide oxalique trouvé (mgr.)	Erreur pour 100
1 cc.	0,48	0,45	0,93	1	+ 7
1	—	0,45	0,93	1,06	+ 13
1	0,40	0,45	0,85	0,89	+ 4
1	—	0,45	0,85	0,90	+ 5
1	0,32	0,45	0,77	0,83	+ 7
1	0,32	0,90	1,22	1,32	+ 8

Il semble donc que la quantité de pigments entraînés soit grossièrement proportionnelle à la quantité d'oxa-

late de calcium précipité. Si l'on acidifie convenablement (pH 5) les mélanges précédents, les résultats deviennent acceptables.

Vol. de résidu mis en oeuvre	Acide oxalique dans la prise d'essai (mgr.)	Acide oxalique ajouté (mgr.)	Acide oxalique total (mgr.)	Acide oxalique trouvé (mgr.)	Erreur pour 100
1 cc.	0,48	0,45	0,93	0,92	— 1
1	—	0,45	0,93	0,91	— 2
1	0,40	0,45	0,85	0,85	0
1	0,32	0,45	0,77	0,76	— 1
1	0,32	0,90	1,22	1,21	— 1

Il est donc nécessaire, après avoir ajouté l'eau de chaux à la solution à doser, de vérifier l'acidité du milieu. Une réaction trop alcaline (pH supérieur à 6) semble aboutir à des résultats trop forts, une réaction trop acide aboutirait au résultat inverse. Il faut donc, comme le dit GUILLAUMIN [19] que la précipitation s'opère dans la zone d'acidité comprise entre pH 4 et pH 5, c'est-à-dire dans la zone de virage du rouge de méthyle.

Cependant, si l'on traite par l'eau de chaux un certain nombre de solutions provenant de diverses urines, on constate que malgré l'observation des conditions d'acidité quelques-uns des précipités obtenus sont encore assez fortement colorés. Nous avons pu éviter cette coloration au moyen de l'acétone dans laquelle ces pigments urinaires sont très solubles. L'acétone doit être ajoutée au mélange à doser après ajustement du pH; ce solvant précipite l'eau de chaux en milieu alcalin mais ne gêne plus le dosage de l'acide oxalique à

pH 5. Nous avons donc adopté l'emploi de l'acétone pour tous les dosages dans l'urine.

Malgré cela le précipité obtenu n'est jamais rigoureusement blanc ; on ne saurait prétendre qu'il est constitué par de l'oxalate de calcium à l'état pur, mais les pigments qui le colorent ne constituent pas dans le dosage manganométrique une surcharge inacceptable.

Nos diverses vérifications le prouvent, de plus, si le permanganate attaque ces pigments, l'oxydation doit être à froid peu marquée et lente (à l'inverse de celle de l'acide oxalique qui, en présence de sulfate manganoux est terminée en moins de trois minutes). Nous avons traité par le permanganate, pendant des temps variables, plusieurs précipités provenant des mêmes urines, les résultats obtenus n'ont entre eux que des différences insignifiantes :

Temps de contact	Permanganate N/100 consommé
3 minutes	2,59
5 —	2,61
10 —	2,64
3 —	1,21
5 —	1,21
10 —	1,23

Par ailleurs, nous avons pu déterminer la teneur en calcium de notre précipité d'oxalate de calcium. Pour cela : 750 cc. de liqueur (provenant de l'épuisement successif de près de 20 litres d'urine) ont été traités à pH 5 par 1.875 cc. d'eau de chaux saturée et 375 cc.

d'acétone. Après 18 heures de contact, le liquide surnageant a été décanté, le précipité recueilli à peu près quantitativement sur un filtre sans plis, lavé et séché à 100°. Ce précipité a été ensuite détaché avec précaution du papier, pulvérisé et séché à poids constant à 100° dans une capsule en platine. Son poids atteignait : 0 gr. 2145.

La capsule a été soumise à la calcination ; le résidu dissous dans l'acide chlorhydrique 1/5 a été additionné d'un très léger excès d'acide sulfurique, puis séché, d'abord à l'étuve à 100°, ensuite dans la flamme d'un Bunsen, enfin calciné et pesé. Le poids de sulfate de calcium obtenu s'est montré de : 0 gr. 1905.

146 gr. d'oxalate de calcium correspondant à 136 gr. de sulfate de calcium, 0,2145 gr. d'oxalate de calcium auraient dû donner : 0 gr. 1998 de sulfate de calcium.

L'erreur absolue est donc de 0 gr. 0093.

L'erreur relative par défaut est de 4,6/100.

Nous pouvons donc dire que l'oxalate de calcium obtenu par notre méthode, s'il ne prétend pas à la pureté totale, s'en rapproche cependant d'une manière acceptable.

En prenant les deux précautions que nous venons d'indiquer : l'acidité du milieu amenée à pH 5, et l'addition d'acétone, les anomalies que nous signalions au début de ce chapitre disparaissent. Les précipités d'oxalate de calcium sont peu colorés ; si l'on traite 1, 2 et 4 cc. d'un même liquide, les quantités d'acide oxalique trouvées sont entre elles sensiblement comme

1, 2 et 4, les quantités rapportées au litre sont concordantes ; enfin si l'on ajoute à un volume connu de ces solutions, une quantité déterminée d'acide oxalique, on la retrouve exactement. Les chiffres suivants le prouvent :

Dosage de l'acide oxalique dans des urines normales

Urine	Vol. de résidu traité	Acide oxalique trouvé rapporté au litre
M ₁₄	1 cc.	5,6
	2	5,4
	4	5,4
P	1	11,42
	2	11,76
	4	11,21
M ₁₅	1	13,12
	2	12,81
	4	12,70
D ₅	1	25,83
	2	25,62
D ₆	1	18,42
	2	18,21

Addition d'acide oxalique aux résidus aqueux provenant de l'épuisement des urines par l'éther

Vol. de résidu mis en œuvre	Acide oxalique dans la prise d'essai (mgr.)	Acide oxalique ajouté (mgr.)	(mgr.) total oxalique Acide	Acide oxalique trouvé (mgr.)	Erreur pour 100
1 cc.	0,30	0,45	0,75	0,76	+ 1,5
2	0,60	0,45	1,05	1,06	+ 1
1	0,36	0,45	0,81	0,80	— 1
2	0,72	0,45	1,17	1,17	0
1	0,12	0,45	0,57	0,57	0
2	0,25	0,45	0,70	0,70	0
4	0,50	0,45	0,95	0,92	— 3
1	0,41	0,45	0,86	0,84	— 2,5
2	0,83	0,45	1,28	1,26	— 2

II. — APPLICATION A L'URINE
DE LA METHODE D'EPUISEMENT PAR L'ETHER

Il nous reste à prouver que l'épuisement d'une urine par l'éther dans les conditions énoncées pour les solutions artificielles aboutit à la priver, à peu près complètement, de son acide oxalique.

L'urine, non filtrée, est additionnée de 50 cc. par litre d'acide chlorhydrique officinal. Cette acidification fait passer sous forme soluble l'acide oxalique qui pourrait être à l'état de sels insolubles (oxalate de calcium presque exclusivement). Cette quantité est suffisante ; GROSSFELD et ses collaborateurs [18] ont montré que l'oxalate de calcium est dissous en 3 à 4 minutes dans

une solution chlorhydrique 0,4 N ; or 50 cc. d'acide chlorhydrique officinal correspondent environ à 21 grammes d'HCl gazeux, l'urine renferme donc 21 grammes d'acide chlorhydrique par litre, ce qui lui confère une acidité voisine de 0,6 N.

Nous savons que dans nos conditions d'appareils, de solvant et de durée, l'extraction est complète en solution pure à 5 pour 100 près. Nous pensons démontrer qu'elle l'est de même avec l'urine.

Plusieurs urines épuisées selon cette technique (soit pendant 72 heures) ont été soumises à une nouvelle extraction de 72 heures. Dans les nouvelles solutions résiduelles, on a dosé l'acide oxalique selon la méthode habituelle, les résultats ont été :

0,76 mgr.	0,84 mgr.	1,5 mgr.
-----------	-----------	----------

Ces quantités, rapportées au taux d'acide oxalique déterminé lors du premier épuisement, représentent un déficit toujours inférieur à 5 pour cent. L'épuisement des solutions pures nous ayant montré que le déficit est de cet ordre de grandeur, nous pouvons donc considérer l'extraction de 72 heures comme pratiquement suffisante.

On peut encore apporter une vérification de cet épuisement, en ajoutant un poids connu d'ac. oxalique à de l'urine préalablement épuisée et en soumettant le mélange au traitement habituel. Les résultats sont consignés ci-dessous :

Vol. d'urine épuisée cc.	Ac. oxalique ajouté (mgr.)	Ac. oxalique trouvé (mgr.)	Erreur pour 100
425	4,5	4,63	+ 3
450	9	9,09	+ 1
450	13,5	13,05	— 3,3

On peut encore se demander si l'acide oxalique passé en solution dans l'éther se retrouve bien dans les 20 cc. de solution aqueuse obtenus après la distillation, étant entendu que les conditions de température précisées à propos des solutions pures ont été scrupuleusement observées. En particulier, on peut craindre que le dépôt noirâtre restant dans le ballon ou sur le filtre, ne fixe une certaine quantité d'acide oxalique.

Le dépôt provenant d'un épuisement a été longuement agité avec de l'acide chlorhydrique étendu, dans le filtrat on a dosé l'acide oxalique selon la technique habituelle, après avoir vérifié que l'acide chlorhydrique était bien neutralisé ; le résultat s'est montré sensiblement nul.

D'autre part, à un tel dépôt on a ajouté 2 cc. d'acide oxalique N/100 ; après un contact de quelques heures, le dosage a donné dans le liquide filtré 2,01 cc.

Etant donné que la solution éthérée est relativement peu colorée, on pourrait être tenté de séparer le volumineux dépôt noirâtre qu'elle contient avant d'opérer la distillation. Cette pratique serait défectueuse, car malgré plusieurs lavages à l'éther, le dépôt conserve alors une quantité importante d'acide oxalique (vraisemblable-

blement parce que ce dépôt a une assez forte teneur en eau).

Nous sommes donc en possession d'une technique d'épuisement par l'éther qui permet d'extraire à très peu près quantitativement, l'acide oxalique de l'urine. Nous avons d'autre part déterminé les conditions dans lesquelles ce même acide oxalique peut être dosé correctement à partir du liquide résultant de l'épuisement de l'urine par l'éther. Il est permis de dire que nous avons constitué une méthode de dosage de l'acide oxalique dans l'urine.

III. — TECHNIQUE PROPREMENT DITE

1° *Réactifs :*

- Acide chlorhydrique officinal.
- Ether ordinaire.
- Eau de chaux saturée (10 cc. d'eau de chaux filtrée doivent neutraliser au moins 4 cc. d'acide chlorhydrique N/10).
- Solution alcoolique de rouge de méthyle à 0,03/100.
- Solution d'acide acétique à 1/10.
- Solution de soude N/1 environ.
- Acétone.
- Suspension de sulfate de baryte à 2/100 (le sulfate de baryum gélatineux convient très bien).
- Solution d'acide sulfurique à 20/100.
- Solution de sulfate manganeux à 2/100.

— Solution de permanganate de potasse à 0,6/1000 (préparée extemporanément par dilution d'une solution à 6/1000).

— Solution d'iodure de potassium à 20/100 ; cette solution doit être incolore.

— Solution d'hyposulfite de soude N/100 (préparée extemporanément par dilution d'une solution N/10 fréquemment vérifiée).

2° Préparation de l'urine :

Un volume connu d'urine (400 à 500 cc) est additionné de 50 cc/1.000 d'acide chlorhydrique. Si le mélange n'est pas limpide, on filtre après quelques minutes de contact ; on doit alors noter le volume du filtrat et tenir compte de la perte de volume.

3° Epuisement :

L'urine, acidifiée est introduite dans le diffuseur D de l'appareil à extraction, on fixe le réfrigérant ascendant et le tube à circulation d'éther lié lui-même au ballon B, puis on chauffe le bain-marie. Lorsque la température d'ébullition de l'éther est atteinte, on la maintient par le seul jeu de la veilleuse du Bunsen. L'extraction commence ; on la poursuivra pendant 72 heures. Ce temps écoulé, on laisse refroidir l'appareil et on ajoute à l'éther contenu dans le ballon B, 10 cc. d'eau distillée, on relie le ballon à un réfrigérant descendant et on distille l'éther au bain-marie à une température voisine de 50°. La solution aqueuse restant après distillation de l'éther est transvasée dans un vase jaugé de 20 cc., le ballon est lavé plusieurs fois

avec 2 cc. d'eau distillée à la fois ; finalement on complète au trait de jauge et on filtre.

4° Dosage de l'acide oxalique dans la liqueur provenant de l'épuisement :

Dans un tube à centrifuger à fond rond de 12 à 20 cc. on introduit :

— 1 à 2 cc. (parfois 4 cc.) de liqueur filtrée provenant de l'épuisement.

— 5 cc. d'eau de chaux saturée.

— II gouttes de solution de rouge de méthyle.

— Si la teinte du liquide est jaune ou orange, quelques gouttes de solution acétique pour obtenir une teinte rose, si la teinte du liquide est rouge groseille, quelques gouttes de solution de soude normale.

— 1 cc. d'acétone.

Les tubes ainsi garnis sont abandonnés au repos à la glacière pendant un temps pouvant être compris entre 6 et 24 heures. Puis on centrifuge après avoir enrobé le précipité dans une suspension de sulfate de baryte dont on ajoute une goutte à chaque tube. On lave à deux reprises avec 1 cc. d'eau glacée chaque fois et l'on passe au dosage manganimétrique.

Le précipité est additionné dans le tube même de V gouttes de solution sulfurique, de II gouttes de solution de sulfate manganeux et de 2 cc. exactement mesurés de solution de permanganate de potasse à 0,6/1.000. On agite légèrement et après cinq minutes on ajoute III gouttes de solution d'iodure de potassium. L'iode libéré est titré par l'hyposulfite en solution N/100 en comparant le tube à décolorer avec un tube renfermant

2 à 3 cc. d'eau et une goutte de suspension de sulfate de baryte. Des opérations identiques sont effectuées sur un égal volume de solution permanganique.

Soit n le nombre de cc. d'hyposulfite employés dans le premier cas, n' le nombre de cc. employés dans le second cas, en multipliant la différence $n' - n$ par 0,45 on obtient en mgr la teneur de la prise d'essai en acide oxalique anhydre.

IV. — VERIFICATIONS ET RESULTATS

La plupart des vérifications ont été exposées dans les deux premiers paragraphes qui traitent de l'établissement de la méthode. Nous les compléterons par les résultats trouvés sur un certain nombre d'urines normales et par les vérifications réalisées par la méthode des quantités d'acide oxalique ajoutées à des urines.

Addition d'acide oxalique a des urines normales (acide oxalique en mgr.)

Acide oxalique par litre d'urine	Acide oxalique dans prise d'essai	Acide oxalique ajouté	Acide oxalique total	Acide oxalique trouvé	pour 100 Erreur
22	9,9	4,5	14,4	13,8	— 4
18,5	8,3	4,5	12,8	12,5	— 2,5
11,6	5,2	4,5	9,7	9,5	— 2
15,2	6,3	4,5	10,8	10,8	0
	6,7	4,5	11,2	11	— 2
17,4	7,8	4,5	12,3	12	— 2,5

Le tableau suivant renferme les taux d'acide oxalique obtenus sur l'urine de divers sujets normaux (adultes des deux sexes, enfants) avec des régimes alimentaires variés (végétarien, carné ou mixte) :

Teneur en ac. oxalique des urines de divers sujets normaux (2).

(ac. oxalique en mgr.)

Date	Sujet	Ac. oxalique d'urine par litre	Ac. oxalique par 24 heures
2 mars	1 ^{er} adulte	18,10	19,90
3 —	—	30,28	31,80
4 —	—	25	25
5 —	—	25,62	28,18
6 —	—	18,21	22,76
7 —	—	22	26,40
8 —	—	28,27	33,21
9 —	—	30	33
10 —	—	30,20	33
15 —	—	27,21	27,21
16 —	—	26,68	30,67
17 —	—	27,50	31,62
18 —	—	29,86	29,86
19 —	—	31,34	34,47
20 —	(1)	43,50	43,50

(1) Ce taux de 43 milligr. se rapporte à un régime mixte fortement additionné d'épinards.

(2) N. B. Les précipités obtenus sont bien constitués par de l'oxalate de chaux. En outre des vérifications déjà citées nous avons fait la réaction de Paget et Berger [69]. L'intensité de cette réaction est voisine de celle fournie par une quantité d'acide oxalique correspondant au poids du précipité examiné.

Date	Sujet	Ac. oxalique par litre d'urine	24 heures red Ac. oxalique
21 —	—	24,50	31,85
22 —	—	24,50	28,17
24 —	2 ^e adulte	27,80	20,85
27 —	—	20	16,50
29 —	—	24,20	21,78
3 mars	3 ^e adulte	35,30	38,83
21 —	4 ^e —	28,40	27
22 —	5 ^e —	31	23,25
23 —	—	37,50	28,10
30 avril	6 ^e —	21,15	42,30
1 ^{er} mai	—	23,80	41,65
1 ^{er} mai	7 ^e —	24,20	24,20
27 mai	8 ^e —	26	31,20
20 mars	1 ^{er} enfant	29,64	12,60
21 —	—	44,10	19,84
20 —	2 ^e enfant	36	14,40

D) EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE DANS LE SANG.

Pour doser l'acide oxalique dans le sang, il est indispensable d'éliminer en premier lieu les protéines. Celles-ci, en effet seraient précipitées lors de l'acidification du sang ou du sérum par l'acide chlorhydrique qui est indispensable pour libérer l'acide oxalique .

L'élimination des protéines se fait généralement en utilisant un réactif général de précipitation de ces matières. Parmi les plus usuels, on peut citer certains acides miné-

raux ou organiques et en particulier l'acide trichloracétique, les sels neutres : sulfate de soude, sulfate d'ammoniaque; les sels des métaux lourds etc... Parmi ces défécants nous avons d'abord éliminé ceux qui sont solubles dans l'éther et ceux dont l'emploi amène une certaine dilution du sang. Parmi les autres, nous avons en premier lieu tenté d'utiliser l'acide chlorhydrique car la suite du dosage exige une forte acidification pour laquelle cet acide convient très bien.

I. — DÉFÉCATION PAR L'ACIDE CHLORHYDRIQUE — Il était tout naturel de penser à cet acide, mais il a l'inconvénient de donner avec le sang à chaud, ou à froid des gelées qui ne laissent exsuder que très peu de liquide.

II. — DÉFÉCATION PAR LE SULFATE D'AMMONIAQUE. — Nous avons tenté d'utiliser ce sel qui avait donné de bons résultats à THOMSEN [81]. D'après ce dernier, on ajoute à 100 cc. de sérum 45 grammes de sulfate d'ammoniaque et on chauffe 5 minutes au bain-marie bouillant; après refroidissement, on ajoute 20 cc. d'acide sulfurique 4 N et on filtre après centrifugation. Au lieu d'acide sulfurique nous avons employé 5/100 d'acide chlorhydrique officinal. La centrifugation a été supprimée car la filtration est suffisamment rapide et donne un liquide parfaitement limpide.

Partant de 500 à 1.000cc. de sérum, nous avons soumis les filtrats à l'épuisement par l'éther dans les appareils qui nous servent habituellement pour les urines. Etant donné la forte densité de ce filtrat, il est impossible d'en épuiser plus de 400 cc.

Les résultats sont consignés ci-dessous ainsi que les vérifications par la méthode des quantités ajoutées et les

vérifications sur des solutions de sulfate d'ammoniaque additionnées d'acide chlorhydrique et d'acide oxalique.

1° *Dosage de l'acide oxalique dans le sang de diverses espèces animales.*

Défécation par $\text{SO}^4 (\text{NH}^4)^2$ suivant THOMSEN
acide oxalique en milligrammes

Espèce animale	Acide oxalique trouvé	Acide oxalique trouvé par une autre méthode
Cheval	0,55	2,66 2,75
Bœuf	1,89 0,53	

2° *Addition d'acide oxalique à du sang de diverses espèces animales.*

Défécation par le sulfate d'ammoniaque (suivant THOMSEN).

acide oxalique en mgr.

Espèce animale	Acide oxal. par litre de sang	Acide oxal. dans prise d'essai	ajouté oxal. Acide	Acide oxal. total	Acide oxal. trouvé	Erreur pour 100
Cheval	0,55	0,33	4,5	4,83	1,41	—70
Bœuf	1,89 0,53	0,95 0,185	9 9	9,95 9,18	5,27 5,85	—47 —35

3° *Addition d'acide oxalique à des solutions de sulfate d'ammoniaque (solution à 45/100).*

Témoin :

Acide oxal. ajouté	Acide oxal. total	Acide oxal. trouvé	Erreur pour 100
9	9	6,97	—22
4,5	4,5	3,60	—20
0,9	0,9	0,40	—55

Dans nos conditions expérimentales (HCl au lieu de SO_4H_2) le sulfate d'ammoniaque se montre très défavorable et nous n'avons pas noté des résultats aussi satisfaisants que ceux de THOMSEN.

III. — ELIMINATION DES PROTÉINES PAR DIGESTION. — Un des inconvénients que présentent les protéines étant de précipiter par l'acide chlorhydrique, nous avons pensé supprimer cette difficulté en hydrolysant les protéines. En effet, les polypeptides et amino-acides résultant de la digestion fermentaire (pepsique ou pancréatique) ne précipitent pas par les acides minéraux.

Nous avons réalisé la digestion par la pepsine. Cette digestion se fait en milieu chlorhydrique et l'acide chlorhydrique n'est pas une gêne pour les opérations ultérieures d'épuisement. La pepsine offre de plus l'avantage de donner des digestés acides, non contaminables par les bactéries (les digestés pancréatiques, au contraire, subissent facilement un ensemencement microbien aboutissant à la putréfaction).

Après divers tâtonnements nous avons adopté pour la digestion la technique suivante :

A un volume déterminé de sérum, 500 cc. par exemple, on ajoute par petites portions 5/100 d'acide chlorhydrique officinal ; le mélange grumeleux obtenu est placé à l'étuve et lorsqu'il a atteint sensiblement la température de 37°, on lui ajoute 1/100 de pepsine en paillettes en agitant énergiquement. On laisse la digestion se poursuivre à l'étuve pendant 24 heures en agitant de temps en temps. Nous avons employé tantôt l'étuve à 37°, tantôt celle à 50° où la digestion est plus rapide. De toute façon, au bout de 24 heures, le liquide digéré, filtré, ne donne plus de précipité par l'acide nitrique.

La digestion terminée, on filtre le mélange chaud en évitant l'évaporation qui concentrerait le liquide. Cette filtration est assez pénible avec le sérum de cheval ; elle est plus rapide avec le sérum de mouton, mais la filtration de 500 cc. de liquide demande cependant de 18 à 24 heures.

Les digestats pepsiques ainsi obtenus peuvent être soumis à l'épuisement par l'éther. Leur acidité est suffisante, il est inutile d'ajouter une nouvelle quantité d'acide chlorhydrique ; avec les appareils décrits précédemment on peut traiter 400 à 450 cc. de liquide digéré. La durée de l'épuisement doit être de 72 heures. La solution éthérée obtenue est incolore ou à peine teintée, on la distille en présence de quelques cc. d'eau distillée (4 cc. environ). Le résidu est filtré sur un petit tampon de coton humide et recueilli dans un gros tube à centrifuger, on rince le ballon dans lequel a eu lieu la distillation avec le moins possible d'eau distillée (4 cc. employés en trois ou quatre fois) qui sert à laver le filtre, et que l'on recueille dans le tube à centrifuger. On ajoute dans celui-ci

10 cc. d'eau de chaux saturée, 1 ou 2 gouttes de solution de rouge de méthyle à 0,03/100, de la soude normale jusqu'à virage au rose et 1 cc. d'acétone. Ce mélange est abandonné au repos dans la glacière pendant 6 à 8 heures, puis le dosage est terminé selon la technique décrite pour les dosages dans l'urine.

Nous avons réalisé un certain nombre d'essais sur des digestats provenant de sérums animaux. Ces dosages ont été vérifiés par la méthode des quantités ajoutées. En outre, nous avons soumis au même épuisement des mélanges renfermant seulement de l'acide chlorhydrique et de la pepsine aux mêmes concentrations que les digestats. Sur les résidus obtenus après distillation de l'éther, nous avons pratiqué le dosage de l'acide oxalique selon la technique que nous venons d'indiquer. Les résultats trouvés sont donnés plus loin ; il nous ont permis d'établir la correction à faire subir à nos dosages d'acide oxalique dans le sang.

Teneur en acide oxalique du sang de trois espèces animales (1).

		mgr. par litre	
Cheval	A	2,27	— 2,35
	B	2,54	— 2,70
Bœuf	H	2,18	
	I	2,76	
	J	2,62	
Mouton	Q	3,84	
	R	3,80	
	S	4,85	
	T	4,46	
	U	3,86	
	V	2,68	
	X	3,02	
	Y	3,86	
	Z	3,71	
	M	3,43	
	O	3,51	
	P	3,15	

(1) N. B. — Les précipités obtenus sont bien constitués par de l'oxalate de chaux comme le prouve la réaction de PAGET et BERGER [69]. L'intensité de cette réaction est voisine de celle fournie par une quantité d'ac. oxalique correspondant au poids du précipité examiné.

Addition d'acide oxalique à du sang de diverses espèces animales.

(acide oxalique en mgr.)

Espèce animale	Acide oxal. par litre de sang	Acide oxal. dans prise d'essai	Acide oxal. ajouté	Acide oxal. total	Acide oxal. trouvé	Erreur pour 100
Cheval	2,27	1,13	4,5	5,63	5,40	—4
	2,54	1,27	4,5	5,77	5,45	—5,5
Bœuf	2,76	1,31	4,5	5,81	5,50	—5
Mouton	3,84	1,92	3,10	5,02	4,77	—5

Expériences témoins effectuées sur des solutions de pepsine (à 1/100) et d'acide chlorhydrique (à 5/100).

Volume de solution (cc.)	MnO ⁴ -K N/100 consommé
425	0,30
425	0,38
400	0,35

Comme l'avait déjà démontré THOMSEN [81], l'oxalémie des mammifères herbivores atteint des chiffres très faibles et sa détermination correcte exige des prises d'essais considérables qu'il est difficile d'obtenir chez l'homme. Quelle que soit la délicatesse des microtechniques, il apparaît difficile, sinon impossible, de la saisir lorsque l'on opère sur 5 et même 20 cc. de sérum. En ceci nous sommes encore en entier accord avec THOMSEN qui note des résultats négatifs avec 50 cc. de sérum et aboutit à un taux de 3,3 mgr. avec 930 cc.

Conclusions

I. — Nous donnons une méthode d'extraction, de précipitation et de dosage de l'acide oxalique en solutions pures ou complexes.

L'erreur relative, toujours par déficit, ne dépasse pas 5,5 pour cent. Nous avons vérifié que le précipité correspondait à 98 pour cent d'oxalate de calcium.

II. — Nous rappelons que l'acide oxalique est volatil à la température du bain-marie et même à partir de 50°. Quelques rares auteurs seulement signalent cette propriété importante dont certaines techniques ne tiennent aucun compte.

III. — Nous observons l'entraînement du citrate de calcium par le phosphate de chaux. Cette propriété vient d'être mise à profit pour la précipitation intégrale du citrate de calcium à froid.

IV. — Nous précisons les conditions expérimentales (pH, concentration, enrobement) à réaliser pour que la présence d'acide citrique ne trouble pas la précipitation de l'oxalate de calcium.

V. — Nous fixons les protocoles de détermination de l'oxalurie et de l'oxalémie. Les erreurs par déficit ne dépassent pas 5,5 pour cent. Nous avons vérifié que le

précipité recueilli était bien constitué par de l'oxalate de calcium.

VI. — L'oxalurie chez 8 sujets normaux adultes soumis à des régimes variés est comprise entre 16,50 et 43,50 mgr. par 24 heures. Chez deux enfants de moins de 6 ans, elle est comprise entre 12,6 et 19,84 mgr. par 24 heures.

VII. — L'oxalémie normale chez les grands herbivores est comprise entre 2,18 et 4,85 mgr. par litre de sérum.

VIII. — Il résulte de nos recherches que la plupart des chiffres donnés pour l'oxalurie proviennent de méthodes imparfaites où les erreurs par défaut sont compensées par des erreurs par excès.

IX. — L'oxalémie apparaît insaisissable avec des prises d'essai qui n'atteignent pas un volume convenable, de l'ordre de plusieurs centaines de centimètres cubes.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
A. LEULIER.

Vu :
LE DOYEN,
J. LÉPINE.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 27 avril 1939.

LE RECTEUR,
PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
A. LIRONDELLE.

BIBLIOGRAPHIE

On trouvera la bibliographie antérieure à 1900 dans les thèses d'ALBAHARY et de SARVONAT.

- (1) ALBAHARY (J.-M.). — L'acide oxalique et ses origines dans l'économie. *Thèse de Doctorat en médecine*, Paris 1903.
- (2) ALBAHARY (J.-M.). — Métabolisme de l'acide oxalique et des oxalates dans l'économie. *C. R. Ac. Sc.* 1903, 136, 1681 et 1912, 154, 1370.
- (3) ANDRÉ (E.). — Sur une nouvelle méthode de séparation des glycérides : la diffusion fractionnée. *Bull. Soc. Chim.* 1932, 51, 870.
- (4) ANDRÉ (E.) — Sur la diffusion fractionnée.... *Bull. Soc. Chim.* 1933, 53, 60.
- (5) ANDRÉ (E.) et BLOCH (A.). — Essai d'application de la méthode de « diffusion fractionnée » à l'analyse immédiate d'une huile de vaseline. *Bull. Soc. Chim.* 1935, 2, 802.
- (6) ATHANASIOU (A.) et REINWEIN (H.). — Recherches sur le métabolisme de l'acide oxalique. *Deutsch. Arch. für Klin. Med.* 1934, 176, 475.

- (7) AUTENRIETH et BARTH (H.). — Sur la présence et le dosage de l'acide oxalique dans l'urine. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1902, 35, 327.
- (8) BAU (A.). — Dosage de l'acide oxalique dans les urines et dans les selles. *Biochem. Ztschr.* 1921, 114, 221.
- (9) DADLEZ (J.) et JANKOWSKA (W.). — Recherche et dosage de l'acide oxalique. *C. R. Soc. Biol.* 1924, 90, 310.
- (10) DAKIN (H.-D.). — Expériences sur les processus d'oxydation de certains corps aliphatiques simples dans les organismes animaux (acide acétique... oxalique...) *Journ. of. biol. Chem.* 1907, 3, 71.
- (11) DENIGES (G.), CHELLE (L.) et LABAT (A.). — Précis de chimie analytique 6^e édition 1930, Maloine, Paris, p. 645.
- (12) DODDS (Ed.-Ch.) et GALLIMORE (E.-J.). — Le dosage de faibles quantités d'acide oxalique. *Biochem. Journ.* 1932, 26, 1242.
- (13) DOURIS (R.) et BECK (J.). — Recherche de l'acide oxalique dans les tissus et dans le sang. *C. R. Soc. Biol.* 1931, 107, 578.
- (14) FLASCHENTRAGER (B.) et MULLER (P.-B.). — La biologie de l'acide oxalique. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1938, 251, 52.
- (15) FRESSENIUS (C.-R.). — Traité d'analyse chimique quantitative, 5^e édition (trad. Forthomme) 1867, Paris. Savy, p. 126 et 924.

- (16) FRESSENIUS (C.-R.). — Traité d'analyse chimique qualitative, 12^e édition (trad. Frenkel) 1922, Paris, Masson, p. 450.
- (17) GRIGNARD (V.). — Précis de chimie organique 1937, Masson, Paris, p. 549.
- (18) GROSSFELD (I.), LINDMANN (E.) et SCHNETKA (M.). — Etude des caractères analytiques de l'acide oxalique. *Ztschr. für analyt. Chem.* 1934, 97, 1.
- (19) GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Faits expérimentaux sur la caractérisation et la mesure de l'oxalémie et de l'oxalorachie. *Bull. Soc. Chim. biol.* 1927, 9, 247.
- (20) GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Sur la mesure de l'oxalémie. *C. R. Soc. Biol.* 1927, 96, 317.
- (21) GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Constatations expérimentales sur la mesure du calcium sanguin après séparation oxalique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, 12, 1269.
- (22) GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Calcium et calcémie chez l'homme. *Bull. Soc. Chim. biol.* 1932, 14, 85.
- (23) HAMMARSTEN (G.). — L'oxalate de calcium, sa solubilité en présence des sels minéraux, remarque au sujet de la mise en évidence de l'oxalurie. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* 1929, 17, 83. d'après *Chem. Abstr.* 1930, 24, 343.
- (24) HERKEL et KOCH (K.). — Recherches sur l'élimination de l'acide oxalique... *Deutsch. Arch. für Klin. Med.* 1934, 178, 511.

- (25) HÖLMBERG (C.-C.). — Le dosage de l'acide oxalique dans l'urine au moyen de la méthode de Widmark. *Biochem. Ztschr.* 1927, 182, 463.
- (26) IZUMI (S.). — Microdosage de l'acide oxalique dans le sang. *Japan. Journ. Med. Sc. II Biochem.* 1933, 2, 195.
- (27) JURGENS (R.) et SPEHR (G.). — Métabolisme physiologique et pathologique de l'acide oxalique. *Deutsch. Arch. für Klin. Med.* 1933, 174, 456.
- (28) KAPELLER-ADLER (R.) et LAUDA (E.). — Sur les acides urinaires solubles dans l'éther ; influence de l'alimentation. *Biochem. Ztschr.* 1933, 258, 429.
- (29) KHOURI (J.). — Détermination de faibles quantités d'acide oxalique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1933, 5, 926.
- (30) KHOURI (J.). — Urémie et oxalémie. *J. P. C.* 1926, 3, 374.
- (31) KHOURI (J.). — Détermination de l'acide oxalique dans l'urine. *Bull. Acad. Méd.* 1927, 97, 35.
- (32) KHOURI (J.). — Dosage de l'acide oxalique dans le sang, l'urine et les humeurs de l'organisme. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1927, 9, 957.
- (33) KHOURI (J.). — Recherches expérimentales sur le dosage de l'acide oxalique à l'état d'oxalate d'urée dans les liquides de l'organisme (réponse à M. Ch.-O. Guillaumin). *Bull. Soc. Chim.* 1927, 9, 961 et *J. P. C.*, 6, 505.

- (34) KHOURI (J.). — Sur quelques cas d'oxalémie. *Bull. Acad. Méd.* 1932, 108, 1083.
- (35) KLEIN (C.) et WERNER (O.). — Mise en évidence micro et histochimique de l'acide oxalique libre ou combiné... *Ztschr. für physiol. Chem.* 1925, 143, 141.
- (36) KOCH (K.). — Dosages en séries de l'acide oxalique dans l'urine. *Biochem. Ztschr.* 1936, 283, 422.
- (37) KOLRAUSCH (F.). — ... Solubilité de l'oxalate de chaux. *Ztschr. für physik. Chem.* 1904-1905, 50, 356 et 1908, 64, 168.
- (38) KOPPLIN (F.). — Méthode de dosage de l'acide oxalique dans le sérum sanguin. *Ztschr. ges. expth. Méd.* 1935, 96, 784.
- (39) KUYPER (A.-C.). — Précipitation quantitative de l'acide citrique. *Journ. of. biol. chem.* 1938, 123, 405 ; d'après *Chim. Ind.* 1939, Janvier, p. 49.
- (40) LAFARGUE (M.). — Recherches biochimiques sur les acides organiques de l'urine humaine. *Thèse Doct. univ. Pharm. Bordeaux* 1932 et *Bull. Soc. Chim. Biol.* 14, 703, 1017 et 1202.
- (41) LAIDLAW (P.-P.) et PAYNE (W.-W.). — Méthode pour le dosage de petites quantités de calcium. *Biochem. Journ.* 1922, 16, 494.
- (42) LAMBLING (E.). — Biochimie de l'acide oxalique. *Rap. 13^e Congrès Français de Médecine, Paris* 1912, p. 81.

- (43) LAMBLING (E.). — Précis de Biochimie, 3^e édition 1921, Masson, Paris, p. 354.
- (44) LAROCHE (Guy) et GRIGAUT (A.). — Les modifications de la cholestérolémie chez les oxalémiques. *C. R. Soc. Biol.* 1928, 98, 1104.
- (45) LEBEAU (P.) et COURTOIS (G.). — Traité de Pharmacie Chimique 1929, Masson, Paris, t. 1, p. 711.
- (46) LEBEAU (P.) et COURTOIS (G.). — Traité de Pharmacie chimique 2^e édition 1938, Masson, Paris, t. 1, p. 993.
- (47) LECŒUR. — L'oxalurie. *Thèse*, Paris 1900 (d'après Albahary).
- (48) LEULIER (A.), VELLUZ (L.) et GRIFFON (H.). — Microdosage du potassium sous forme de cobaltinitrite. *Bull. Soc. Chim. biol.* 1928, 10, 891.
- (49) LEULIER (A.), VELLUZ (L.) et GRIFFON (H.). — Sur le microdosage de l'acide oxalique à l'état d'oxalate de calcium dans les solutions pures ou complexes. *Bull. Soc. Chim. biol.* 1929, 11, 46.
- (50) LOEPER (M.) et BÉCHAMP. — L'oxalémie. *Progrès Médical* 22 juillet 1911, p. 349.
- (51) LOEPER (M.). — Oxalémie et oxalurie. Rap. 13^e Congrès Français Médecine, Paris, 1912, p. 1.
- (52) LOEPER (M.) et TONNET (J.). — Comment on reconnaît l'oxalémie. *Journ. Méd. Français* 1924, p. 207.

- (53) LOEPER (M.). — Les origines de l'oxalémie chez l'homme. *Nutrition* 1933, 3, 1.
- (54) LUZZATO. — Sur la physiologie de l'acide oxalique et de l'acide oxalurique dans l'urine. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1902-1903, 37, 225.
- (55) MAC LEAN (H.). — Sur le dosage de l'acide oxalique dans l'urine. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1909, 60, 20.
- (56) MAUGERI (S.). — Le dosage de l'acide oxalique dans l'urine. *Ztsch. für physiol. Chem.* 1933, 217, 138.
- (57) MAUGERI (S.). — Les connaissances actuelles sur le métabolisme de l'acide oxalique. *Riforma Medica* 1932, 48, 594.
- (58) MAUGERI (S.). — Sur les origines et sur les variations de l'oxalémie physiologique. *Riforma Medica* 1932, 48, 1094.
- (59) MERZ (W.) et MAUGERI (S.). — Sur la présence et le dosage de l'acide oxalique dans le sang. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1931, 201, 31.
- (60) MESTREZAT (W.). — La solubilité de l'oxalate de chaux dans l'eau dans ses rapports avec les microméthodes de dosage du calcium dans le sang et les humeurs. *Bull. Soc. Chim. biol.* 1923, 5, 263.
- (61) MEYER ZU HORSTE (G.). — Procédé de dosage de l'acide oxalique dans l'urine. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1927, 168, 196.

- (62) MISLOWITZER (E). — Sur le dosage de l'acide oxalique dans l'urine. *Biochem. Ztsch.* 1921, 126, 77.
- (63) MONTARIOL. — Contribution à l'étude de l'oxalémie chez l'homme. *Thèse Doct. Univ. Pharm.*, Toulouse 1935.
- (64) MOREL (A.) et SARVONAT (F.). — Sur le dosage de l'acide oxalique dans le sang et dans les organes. *Bull. Soc. Chim.* 1912, 11, 632 et *Lyon Médical* 1912, 118, 1116.
- (65) OIKAWA (S.). — Dosage de l'acide oxalique dans l'urine. *Japan. Journ. Méd. Sc. II Biochem.* 1937, 3, 211.
- (66) OIKAWA (S.). — Elimination urinaire journalière de l'acide oxalique. *Japan Journ. Méd. Sc. II Biochem.* 1937, 3, 217.
- (67) PAGET (M.) et BERGER (R.). — Sur une nouvelle réaction colorée de l'acide oxalique. *J. P. C.* 1938, 27, 577.
- (68) PAGET (M.) et BERGER (R.). — Sur le dosage de l'allantoïne dans l'urine humaine et sur la réaction colorée de Schryver Fosse qui en est à la base. Applications. *C. R. Soc. Biol.* 1938, 127, 1312.
- (69) PAGET (M.) et BERGER (R.). — Recherches sur la réaction de Schryver Fosse et sur ses applications analytiques. *C. R. Acad. Sc.* 1938, 207, 800.

- (70) RENAUDIN (J.). — Sur les microdosages oxalimétriques. *J. P. C.* 1936, 23, 447.
- (71) RICHARDS (T.-W.), Mc CAFFREY (Ch.-F.) et BISBEC (H.). — L'exclusion d'oxalate de magnésium par l'oxalate de calcium, la solubilité de l'oxalate de calcium. *Ztschr. anorg. Chem.* 1901, 28, 71.
- (72) RODILLON (G.). — Oxalorachie. *Nutrition* 1933, 3, 43.
- (73) SALKOWSKI (F.). — Sur le dosage de l'acide oxalique et la présence d'acide oxalurique dans l'urine. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1900, 29, 437.
- (74) SARVONAT (F.). — Recherches sur l'acide oxalique dans l'organisme animal. *Thèse Doct. Sc.* Lyon, 1913.
- (75) SERKOWSKI (S.) et MOZDZENSKI. — Sur ce que l'on appelle « oxalurie ». *Ztschr. für physiol. Chem.* 1910, 70, 264.
- (76) SCHULER (B.) et RENNKAMP (F.). — Méthode de dosage de l'acide oxalique dans le sérum sanguin. *Ztschr. ges. expatl. Méd.* 1935, 95, 508.
- (77) SIEGFRIED (M.). — Note sur l'oxydation du phénol au moyen du nitrobenzol. *Journ. für pratk. Chem.* 1885, 139, 542.
- (78) SUZUKI (S.). — L'acide oxalique du sang. *Japan Journ. Méd. Sc. II. Biochem.* 1934, 2, 291.

- (79) SUZUKI (S.). — L'oxalémie chez différentes espèces animales. *Japan. Journ. Méd. Sc. II Biochem.* 1934, 2, 427.
- (80) SUZUKI (S.). — Remarques sur le dosage direct de l'acide oxalique du sang (réponse à Thomsen) *Ztschr. für physiol. Chem.* 1936, 244, 235.
- (81) THOMSEN (A.). — Sur la teneur du sang en acide oxalique. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1935, 237, 199.
- (82) TONNET (J.). — Dosage de l'acide oxalique dans le sang. *Nutrition* 1933, 3, 15.
- (83) VAN SLYKE (D.-D.) et SENDROY (J.). — Dosage gazométrique de l'acide oxalique et du calcium. *Journ. Biol. Chem.* 1929, 84, 217.
- (84) VAN SLYKE (D.-D.) et NEIL (J.-M.). — Le dosage manométrique des gaz extraits par le vide du sang et de diverses solutions. *Journ. Biol. Chem.* 1924, 61, 523.
- (85) VELLUZ (L.) et DESCHASEAUX (R.). — Recherches expérimentales sur les techniques calcimétriques « à l'oxalate ». *Bull. Soc. Chim. biol.* 1931, 13, 797.
- (86) WEGRZYNOWSKI (L.). — Contribution à l'étude de l'origine de l'acide oxalique dans l'organisme des animaux et de l'homme. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1913, 83, 112.

- (87) WIDMARK (E.-M.-P.). — Une nouvelle méthode pour l'épuisement quantitatif des liquides. *Skand. Arch. für Physiol.* 1926, p. 84. D'après Widmark [88].
- (88) WIDMARK (E.-M.-P.). — Dosage de l'acide benzoïque libre et combiné par la méthode d'extractions par balancements. *Biochem. Ztschr.* 1926, 179, 263.
- (89) WIDMARK (E.-M.-P.). — Le dosage dans l'urine des acides solubles dans l'éther au moyen de l'extraction par agitation. *Biochem. Ztschr.* 1929, 215, 434.
- (90) WURTZ (Ad.). — Dictionnaire de chimie pure et appliquée. Hachette, Paris, p. 671.
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION	15

PREMIERE PARTIE

Travaux antérieurs

<i>Chapitre Premier</i> : TRAVAUX ANTERIEURS CONCERNANT L'ACIDE OXALIQUE DE L'URINE	19
I. — Premières méthodes d'évaluation..	20
II. — Les méthodes de dosages	22

<i>Chapitre II</i> : TRAVAUX ANTERIEURS CONCER- NANT L'ACIDE OXALIQUE DU SANG NORMAL	43
--	----

<i>Chapitre III</i> : RESULTATS APPORTES PAR LES AUTEURS	57
I. — Acide oxalique urinaire	58
II. — Acide oxalique dans le sérum san- guin de l'homme normal	60
III. — Acide oxalique dans le sérum san- guin de diverses espèces animales.	62

<i>Chapitre IV : CRITIQUES DES METHODES DE</i> <i>DOSAGE DE L'ACIDE OXALIQUE</i>	65
I. — Méthodes intéressant l'urine	65
II. — Méthodes intéressant le sang	77

DEUXIEME PARTIE

Recherches personnelles

<i>Chapitre Premier : DOSAGE DE L'ACIDE OXA-</i> <i>LIQUE EN SOLUTIONS PURES</i>	87
A) Précipitation de l'oxalate de chaux	87
Emploi du chlorure de calcium	88
— de l'acétate de calcium	89
— de l'eau de chaux	90
B) Isolement du précipité	93
C) Oxydation de l'oxalate de chaux	95
D) Méthode de dosage en solutions pures	99
<i>Chapitre II : EXTRACTION DE L'ACIDE OXA-</i> <i>LIQUE A PARTIR DE SOLUTIONS DIVER-</i> <i>SES</i>	101
A) Extraction à partir de solutions pures	101
I. — Les procédés d'extraction	103
II. — Le procédé adopté. L'extraction continue de l'acide oxalique en solutions pures	104
a) L'appareil	104
b) Fonctionnement de l'appareil	107

c)	Distillation de la solution éthérée ..	108
d)	Résultats obtenus	113
B) Application de l'extraction continue aux solutions complexes artificielles. 117		
I. — Influence de l'acide citrique		118
a)	Le citrate de calcium précipite à chaud	121
b)	Le citrate de calcium précipite à froid	122
c)	Surcharge des précipités d'oxalate de calcium par du citrate de calcium. 122	
d)	Le citrate de calcium précipite à froid sous l'influence du phosphate tricalcique	123
e)	A partir d'un certain taux l'acide citrique empêche la précipitation de l'oxalate de chaux	125
II. — Influence de l'acide lactique		132
III. — — — hippurique ..		133
IV. — — — formique		135
V. — — globale de la totalité des acides organiques uri- naires		136
C) Extraction et dosage de l'acide oxalique dans les urines		141

I. — Etablissement d'une technique de dosage de l'acide oxalique dans les résidus d'épuisement urinaires	142
II. — Application à l'urine de la méthode d'épuisement par l'éther.	148
III. — Technique proprement dite	151
IV. — Vérifications et résultats	154
D) Extraction et dosage de l'acide oxalique dans le sang	156
I. — Défécation par l'acide chlorhy- drique	157
II. — Défécation par le sulfate d'ammo- niaque	157
III. — Elimination des protéines par di- gestion	159
CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAPHIE	167

1939

IMPRIMERIE A. VOLLAIRE & C^{ie}

V. VOLLAIRE Succ^r

32, Rue Carnot - GAP

